Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Nachweis und Signifikanz von organspezifischen Antikörpern gegen Lebermitochondrien (Anti M 9) bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose und deren Angehörigen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
REINHILD KLEIN
aus Tübingen

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546518_0003

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Nachweis und Signifikanz von organspezifischen Antikörpern gegen Lebermitochondrien (Anti M 9) bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose und deren Angehörigen

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard - Karls - Universität
Tübingen

vorgelegt von
REINHILD KLEIN
aus Tübingen

1985

Dekan:	Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter:	Professor Dr. P. A. Berg
2. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Dölle

---

gedruckt bei H.- J. Köhler ' Reprografischer Betrieb ' Tübingen

Die Anregung zu diesem Thema verdanke ich Herrn Prof. Dr. P.A. Berg. Durch zahlreiche Diskussionen hat er das Voranschreiten der Arbeit gefördert und sie durch sein Interesse ermutigend unterstützt. Dafür möchte ich mich bei ihm sehr herzlich bedanken.

Herrn Dipl. Biochem. E. Stechemesser danke ich für seine unermüdliche und selbstlose Hilfsbereitschaft, Frau Dipl. Biochem. J. Lindenborn-Fotinos für die Einarbeitung in das Gebiet und Frau P. Wilhelm für die Unterstützung bei vielen serologischen Untersuchungen.

Auch allen anderen Mitarbeitern des immunpathologischen Labors von Prof. Berg herzlichen Dank für die konstruktive Zusammenarbeit.

Frau M. Dürnay verdanke ich die perfekt gezeichneten Abbildungen und die photographischen Arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	PATIENTEN UND METHODEN	6
I.	Patienten	6
1.	Patienten mit primär-biliärer Zirrhose	6
1.1.	Kollektive von PBC Patienten	6
1.2.	Krankheitsverläufe von Patienten mit PBC	7
2.	Seren von Familienangehörigen von Patienten mit PBC	9
2.1.	Familie A	9
2.2.	Familie B	10
2.3.	Familie C	10
2.4.	Familie D	10
2.5.	Familie E	11
2.6.	Familie F und G	11
2.7.	Familie H	11
2.8.	Familie I	11
3.	Seren von Patienten mit antimitochondrialen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität	12
4.	Patienten mit AMA negativen Erkrankungen	12
5.	Laborpersonal	13
II.	Methoden	14
1.	Antigene	14
1.1.	Mitochondrien	14
1.1.1.	SN 40	14
1.2.	Submitochondriale Partikel (SMP)	14
1.2.1.	SMP-SN	15
1.3.	Neurospora crassa	15
1.4.	ATPase	15

Seite

1.5.	Innere und äußere Mitochondrienmembranen (inner and outer membranes), Mikrosomen	16
1.6.	Plasmamembranen	16
1.7.	Cardiolipin	16
2.	Enzymmarker	17
3.	Isolierung von Antigenen aus SMP-SN durch Säulenchromatographie	17
4.	Trennung mitochondrialer Antigene durch Sucrose-Dichtegradienten	17
5.	Behandlung der Antigene mit verschiedenen Enzymen	18
5.1.	Trypsinbehandlung	18
5.2.	Nagarsebehandlung	19
5.3.	Behandlung mit DNAaseI, RNAase A und Lipase	19
6.	Absorption von verschiedenen Seren mit unterschiedlichen submitochondrialen Fraktionen	20
7.	Proteinbestimmung	20
8.	Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern, insbesondere von antimitochondrialen Antikörpern in Patientenseren	21
8.1.	Nachweis von Autoantikörpern im Immunfluoreszenztest	21
8.2.	Nachweis von AMA in der Komplementbindungsreaktion	21
8.3.	Nachweis von AMA im Immundiffusionstest	22
8.4.	Nachweis von AMA im fluorometrischen Immunoassay (FIAX)	22
8.5.	Nachweis von AMA im ELISA	22
8.5.1.	Prinzip des ELISA	22
8.5.2.	Standardisierung	23
8.5.2.1.	Antigenkonzentration	23
8.5.2.2.	Serumverdünnung	24
8.5.2.3.	Verdünnung der Peroxidase konjugierten antihuman Antikörper	25
8.5.2.4.	Substrat	25

Seite

8.5.2.5. Reproduzierbarkeit und Validität sowie Standardisierung des Nachweises von AMA im ELISA 25

9. Nachweis von Rheumafaktoren 26

10. Quantitative Immunglobulinbestimmung in Patientenseren 26

11. Hepatitisserologie 26

12. Bestimmung verschiedener Laborwerte 27

13. Statistische Berechnungen 27

C. ERGEBNISSE 28

1. Hinweis auf das Vorkommen organspezifischer Antikörper gegen Lebermitochondrien beim Testen von PBC Seren auf Anti M 2 Antikörper im ELISA 28

2. Nachweis von organspezifischen Antikörpern gegen Lebermitochondrien in PBC Seren durch Absorptionsstudien 38

2.1. Normalserum 38

2.2. Absorption des Anti M 3-Serums 39

2.3. Absorption des Anti M 6-Serums 40

2.4. Absorption von Anti M 2 positiven Seren 40

2.4.1. Absorption von Serum Nr. 1 40

2.4.2. Absorption von PBC Serum Nr. 2 43

2.4.2.1. Getestet im ELISA 43

2.4.2.2. Darstellung der Absorption von Serum Nr. 2 in der Immundiffusion 45

2.4.3. Absorption von PBC Serum Nr. 3 46

2.5. Absorption des Mischform-Serums 46

2.6. Zusammenfassung 49

3. Lokalisation und Charakterisierung von M 9 49

3.1. Bestätigung der Organspezifität von M 9 50

3.1.1. Reaktion von Anti M 9 mit Mitochondrien aus verschiedenen Organen 50

Seite

3.1.2.	Reaktion von Anti M 9 mit Mitochondrien aus Neurospora crassa	50
3.2.	Lokalisation von M 9	53
3.3.	Reaktion von M 9 auf Behandlung mit verschiedenen Enzymen im Vergleich zur Reaktion von M 2	53
3.4.	Dichte von M 9	56
4.	Unterscheidung von Anti M 9 von anderen antimitochondrialen Antikörpern im ELISA mit Hilfe verschiedener Antigenfraktionen	57
4.1.	Unterscheidung Anti M 9 - Anti ANT Antikörper	57
4.2.	Differenzierung von Anti M 9 von Anti M 1 - Anti M 8 Spezifitäten	58
4.2.1.	Säulenchromatographische Auftrennung von SMP-SN aus verschiedenen Organen	58
4.2.2.	Differenzierung von Anti M 1 - Anti M 9 mit Hilfe von SMP aus verschiedenen Organen und spezifischen Antigenfraktionen	63
5.	Klinische Bedeutung der Anti M 9 Antikörper	65
5.1.	Klinische Relevanz von Anti M 9 bei PBC Patienten	65
5.1.1.	Häufigkeit von Anti M 9 bei 171 Patienten mit PBC	65
5.1.2.	Immunglobulinklassen von Anti M 9 Antikörpern	67
5.2.	Häufigkeit und Bedeutung von Anti M 9 Antikörpern bei Patienten mit anderen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen	68
6.	Darstellung von Krankheitsverläufen bei PBC Patienten im Hinblick auf die Konstellation von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern	72
6.1.	Patientin S.R.	72
6.2.	Patientin F.E.	72
6.3.	Patientin B.T.	75
6.4.	Patientin B.I.	76
6.5.	Patientin W.E.	76

Seite

7. Autoantikörper bei Angehörigen von Patienten mit PBC 79

7.1. Literaturübersicht 79

7.2. Eigene Beobachtungen 81

7.2.1. Untersuchung der Familien auf Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper im ELISA 82

7.2.1.1. Darstellung der serologischen Befunde in den Familien A-H mit Hilfe von Stammbäumen 82

7.2.1.2. Familie I 91

8. Untersuchung von Seren von medizinisch-technischen Angestellten (MTA) auf AMA 92

9. Nachweis von komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern gegen M 9 95

D. DISKUSSION

1. Verbesserung der serologischen Diagnose der PBC mit Hilfe des ELISA 96

2. Unterschiede der Antigendeterminanten an Herz-, Leber- und Nierenmitochondrien 97

3. Heterogenität der AMA bei der PBC 98

4. Klinische Bedeutung von Anti M 9 100

5. Hypothesen und Aspekte im Hinblick auf die Ätiologie der PBC 104

E. ZUSAMMENFASSUNG 105

F. LITERATURVERZEICHNIS 107

A. EINLEITUNG

Die primär-biliäre Zirrhose (PBC) wurde zuerst 1851 von Addison und Gull (2) und 1876 von Hanot (47) beschrieben und wegen des erhöhten Cholesterinspiegels im Serum und der Xanthome der Haut als "xanthomatöse biliäre Zirrhose" bezeichnet.

Erst 100 Jahre später führten die Veröffentlichungen von Ahrens et al. (3) und Sherlock (101) zu einer allgemeinen Anerkennung der "primär-biliären Zirrhose", wie die Erkrankung seitdem genannt wird, als eigenständigem Krankheitsbild. Eine weitere Arbeit von Rubin et al. (90) führte 1965 die exaktere Bezeichnung "chronisch nicht eitrige destruierende Cholangitis" ein.

Früher hielt man die primär-biliäre Zirrhose für eine sehr seltene Krankheit. Noch in einer Studie des Rockefeller Institutes von 1950 wurden lediglich 25 Fälle beschrieben (3). Wie drei neuere Studien im Jahre 1980 ergaben, liegt heute auf Grund einer verbesserten Diagnostik die Prävalenz bei 40-54 Fällen/10^6 Einwohner mit einer Neuerkrankungdrate von 5,8-10,6 Fällen/10^6 Einwohner im Jahr (45, 48, 109).

Die Ätiologie der PBC ist unbekannt. Es werden genetische Prädisposition zusammen mit viralen oder mikrobiellen Faktoren diskutiert (52, 94). Vorwiegend sind Frauen im Alter von 40-60 Jahren betroffen (102). Dank der Frühdiagnose in asymptomatischen Stadien wird die PBC heute aber immer häufiger auch bei Frauen zwischen 20 und 30 Jahren gefunden (35, 69, 89).

Typisch für die PBC ist der schleichende Beginn mit Juckreiz und Abgeschlagenheit, gefolgt von Ikterus. Bei einigen Patienten tritt der Ikterus auch vor oder zu-

sammen mit dem Pruritus auf. Weitere Symptome sind Hyperpigmentation, Hirsutismus, Diarrhoe und Gewichtsverlust. Selten beginnt die Erkrankung mit Symptomen der portalen Hypertension.

Häufig wird die Diagnose heute zufällig gestellt, d.h. in asymptomatischen Stadien infolge pathologischer Werte bei Routineuntersuchungen, die auf eine Leberfunktionsstörung hinweisen.

Zu den typischen Laborbefunden gehören deutlich erhöhte Spiegel der Alkalischen Phosphatase (AP) und anderer Enzyme, die auf eine Cholestase hinweisen, wie die Gammaglutamyltransferase (γ-GT). Die Transaminasen sind nur leicht erhöht. Einen Anstieg des Bilirubins findet man erst in späteren Stadien (100).
Bei den meisten Patienten liegt eine Erhöhung der Immunglobuline - insbesondere des IgM - vor (102).

Die primär-biliäre Zirrhose beginnt mit einer Schädigung des Epithels der kleinen Gallengänge und einer zellulären Reaktion, die Lymphozyten, Plasmazellen, Eosinophile und Histiozyten einschließt. Gewöhnlich bilden sich Granulome (Stadium I). Die Gallengänge werden zerstört und durch lymphoide Zellen markiert; die Ductuli beginnen zu proliferieren (Stadium II). Die nun auftretende Fibrosierung (Stadium III) geht von den Portalfeldern aus. Es treten piece meal Nekrosen in unterschiedlichem Ausmaß auf; deshalb kann es schwierig sein, die PBC von einer chronisch aktiven Hepatitis (CAH) zu unterscheiden. Hinweis für die Diagnose der PBC ist in diesem Stadium der Verlust der Gallengänge. Die fibrösen Septen zerstören schrittweise die Architektur der Leber (Stadium IV), es bilden sich Regenerationsknoten, die oft unregelmäßig verteilt sind und daher nicht immer in einer Biopsie erfaßt werden können.

Diese Stadieneinteilung nach Scheuer (95) ist inzwischen weitgehend anerkannt, obwohl nicht immer das richtige Stadium erfaßt wird, da alle Stadien in einer Biopsie vorkommen können oder das eigentliche Stadium, z.B. ein zirrhotischer Umbau, in dem Leberpunktat nicht erfaßt wurde.

Die primär-biliäre Zirrhose hat viele Merkmale, die auf einen immunpathologischen Mechanismus hinweisen, und auf Grund derer sie den Autoimmunerkrankungen zugeordnet wird. Dazu gehören die häufige Assoziation mit anderen Autoimmunkrankheiten, wie dem Sjögren-Syndrom (4, 41), der Arthritis (77, 102), Thyroiditis (25, 99) und Sklerodermie (24, 82, 87), eine abnorme Komplementaktivierung und -clearance (84), hohe Immunkomplexspiegel (43, 106, 107), unspezifische Veränderungen der humoralen und zellulären Immunität (36, 37) und abnorme in vitro Funktionstests der Immunregulation (75), auch eine verminderte Funktion der Suppressorzellen (78).

Ein weiterer Befund, der die PBC als Autoimmunerkrankung erscheinen läßt, ist das Vorkommen von Autoantikörpern in Patientenseren, wie Antikörpern gegen T - Lymphozyten (78), glatte Muskulatur (54, 74), Kerne (ANA) und Mitochondrien (AMA), wobei den antimitochondrialen Antikörpern die größte diagnostische Bedeutung zukommt. Diese wurden zuerst 1958 von Mackay in der Komplementbindungsreaktion (71) und 1965 von Walker et al. im indirekten Immunfluoreszenztest entdeckt (112).

Nach Berg et al. (15) sind diese Antikörper gegen ein Antigen der inneren Mitochondrienmembran gerichtet. Diese Beobachtung wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen bestätigt (19).

In einer prospektiven Studie mit 236 PBC Patienten konnten in 91% der Fälle AMA nachgewiesen werden (23).

Munoz et al. (81) vertraten die Ansicht, daß es eine AMA negative PBC entweder nicht gibt oder daß sie nur sehr selten vorkommt: von 218 Patienten waren nur 2 AMA negativ. In einer weiteren Studie konnten in 87% von 103 Patienten im Immunfluoreszenztest AMA entdeckt werden (61).

Die Spezifität dieser Antikörper wurde jedoch angezweifelt (46, 49, 64), da sie auch bei anderen Erkrankungen vorkommen können.

Während aber PBC Seren spezifisch mit einem Antigen der inneren Mitochondrienmembran reagieren, ergaben Seren von Patienten mit anderen AMA Spezifitäten wie Anti M 1 (116), Anti M 3 (42, 92), Anti M 5 (63), Anti M 6 (50), Anti M 7 (60) keine positive Reaktion mit diesem sogenannten M 2 Antigen (13).

M 2 wird bei der Präparation aus Rinderherzmitochondrien zusammen mit dem F 1 Sektor der H^+-ATPase von der Membran gelöst. Es ist aber nicht mit diesem Enzym identisch, da bei einer weiteren Reinigung der ATPase die Enzymaktivität klar von der Antigenaktivität getrennt werden kann (93).

Anti M 2 Antikörper sind kreuzreagierende Antikörper. So wurde das M 2 Antigen auch an der Mitochondrienmembran von Neurospora crassa und in der aus Chloroplasten isolierten CF 1-ATPase Fraktion gefunden (8,11).

Im fluorometrischen Immunoassay (FIAX) konnten bei 97% von 94 PBC Patienten Anti M 2 Antikörper nachgewiesen werden. Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen reagierten nicht mit dem M 2 Antigen (14).

Die Beobachtung von Miyachi et al. (80), daß PBC Seren mehrere präzipitierende Antikörper gegen Mitochondrien

aus Rattenleber enthalten können, weist jedoch darauf hin, daß es in diesen Seren außer den Anti M 2 Antikörpern noch weitere antimitochondriale Antikörper geben muß. So konnten in Seren von Patienten mit PBC auch Antikörper nachgewiesen werden, die mit Antigenen der äußeren Mitochondrienmembran reagieren (Anti M 4, Anti M 8; 17, 18), jedoch immer nur in Assoziation mit Anti M 2 Antikörpern vorkommen.

Schultheiß et al. (97) beschrieben organspezifische Antikörper gegen den [illegible] an der inneren Membran von Lebermitochondrien. Aus der Studie von Berg et al. [illegible] geht hervor, daß PBC Seren Antikörper enthalten, die andere Antigendeterminanten als M 2 erkennen können, u.a. auch ein organspezifisches Antigen an Lebermitochondrien.

In dieser Arbeit soll anhand von Absorptionsstudien einzelner PBC Seren mit verschiedenen mitochondrialen Antigenfraktionen die Existenz solcher organspezifischer Antikörper bewiesen werden und die Antigendeterminanten, gegen die sie gerichtet sind, näher charakterisiert sowie auf ihre Häufigkeit und klinische Relevanz bei PBC Patienten eingegangen werden.

Außerdem interessierte es uns, festzustellen, ob auch bei Angehörigen von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose antimitochondriale Antikörper mit gewisser Spezifität vorkommen, da schon früher in dieser Gruppe häufiger AMA als in der Normalbevölkerung beobachtet (34, 39, 91, 111) und familiäre Häufungen von PBC beschrieben worden sind (21, 22, 23, 32, 33, 35, 104).

B. PATIENTEN UND METHODEN

I. Patienten

1. Patienten mit primär-biliärer Zirrhose

1.1. Kollektive von PBC Patienten

Wir untersuchten 94 der 103 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC), die im DRK-Krankenhaus Hamburg über 10-20 Jahre beobachtet worden waren (61) auf antimitochondriale Antikörper (AMA). Histlogie, Geschlecht und Alter dieser Patienten sind in Tabelle 1a aufgeführt. Bei allen 94 Patienten lag histlogisch eine klassische PBC vor, Patienten mit chronisch cholestatischer Hepatitis (Mischform) (62) wurden nicht in diese Gruppe aufgenommen.

Ein weiteres Kollektiv von 77 Patienten mit PBC kam aus der Heinz-Kalk-Klinik, Bad Kissingen. Die klinischen Daten wurden uns von Prof. Dr. med. D. Müting überlassen. Sechs dieser Patienten hatten histologisch ein Mischbild mit einer chronisch aktiven Hepatitis (Tabelle 1b).

Alle anderen PBC Seren stammten entweder von Patienten aus der Medizinischen Klinik Tübingen oder von Patienten aus auswärtigen Krankenhäusern und waren uns zur serologischen Untersuchung zugeschickt worden.

Tabelle 1 Histologie, Alter und Geschlecht von 171 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose

a) aus dem DRK-Krankenhaus Hamburg (n=94)

histologisches Stadium	Anzahl Patienten gesamt	Frauen	Männer	mittleres Alter (Bereich) in Jahren
I	46	41	5	54 (39-78)
II	18	15	3	54 (34-67)
III	14	13	1	58 (44-72)
IV	16	15	1	57 (34-84)
gesamt	94	84	10	55 (34-84)

b) aus der Heinz-Kalk-Klinik, Bad Kissingen (n=77)

histologisches Stadium	Anzahl Patienten gesamt	Frauen	Männer	mittleres Alter (Bereich) in Jahren	histologisch Mischform
I	17	15	2	52 (27-69)	1
II	15	12	3	54 (43-68)	2
III	10	8	2	54 (41-65)	0
IV	35	35	0	57 (36-75)	3
gesamt	77	70	7	55 (27-75)	6

1.2. Krankheitsverläufe von Patienten mit PBC

Von fünf Patienten wurden Seren im Verlauf der Erkrankung auf AMA untersucht.

Bei der Patientin S.R. (Jg. 1937) aus der Heinz-Kalk-Klinik, Bad Kissingen besteht seit 1975 auf Grund erhöhter Leberwerte Verdacht auf eine PBC, der auch hi-

stologisch bestätigt werden konnte. Klinisch stehen Juckreiz und Oberbauchbeschwerden im Vordergrund. Die Patientin befindet sich im Frühstadium der Erkrankung. Eine Progression ist nicht erkennbar.

Seren und Daten der Patientin F.E. (Jg. 1917) überließ uns Dr. Schmitz-Berning (Neuss). Die Lebererkrankung der Patientin ist seit 1969 bekannt. Seither klagt sie auch über Gelenkbeschwerden, 1981 trat Juckreiz hinzu. Histologisch war 1971 ein Zustand nach Hepatitis und eine Verfettung der Leber festgestellt worden, eine erneute Biopsie lehnte die Patientin ab. Klinisch besteht starker Verdacht auf PBC im Frühstadium bei erhöhter Alkalischer Phosphatase, GOT und GPT und isolierter IgM Erhöhung. Das Bilirubin ist normal.

Die Patientin B.T. (Jg. 1912) kommt aus dem Wilhelminenspital der Stadt Wien von Prof. Dr. H. Thaler. Sie klagt seit 1980 über zeitweise auftretende Oberbauchbeschwerden, seit Mai 1982 sind pathologische Leberwerte bekannt, insbesondere bestehen eine Erhöhung der AP und eine isolierte IgM Erhöhung. Die Histologie ergab 1982 eine gering aktive CAH.

Die Patientin B.I. (Jg. 1926) klagt seit 1972 über kolikartige Oberbauchbeschwerden. Damals wurde eine beschleunigte BSB und erhöhte Immunglobuline, besonders auch eine IgM Erhöhung festgestellt. Transaminasen und AP waren normal. Eine Leberbiopsie 1976 ergab eine PBC im Stadium I. Erst ab 1977 begannen die Leberwerte anzusteigen. 1978 wurde eine Cholezystektomie wegen Cholezystolithiasis durchgeführt, die kolikartigen Oberbauchbeschwerden ließen aber nicht nach. Seit dieser Zeit wird die Patientin mit Azathioprin und Steroiden behandelt. Seren der Patientin standen uns seit 1976 zur Verfügung.

Die Patientin W.E. (Jg. 1943) aus der Medizinischen Klinik Tübingen hatte die ersten Symptome besonders in Form von Pruritus 1975 während der ersten Gravidität. Die Krankheit ging innerhalb von fünf Jahren vom Stadium I/II in Stadium IV über. Sechs Jahre nach der Diagnosestellung starb die Patientin. AP, Transaminasen und Bilirubin waren starken Schwankungen unterworfen. Zwischenzeitlich erhielt die Patientin Steroide.

2. Seren von Familienangehörigen von Patienten mit PBC

Für die Familienstudie wurden 8 Familien von PBC Patienten ausgesucht, von denen wir vollständige klinische Angaben hatten. In Famile A und B waren zwei bzw. drei Personen an primär-biliärer Zirrhose erkrankt.

2.1. Familie A

In Familie A haben eineiige Zwillingsschwestern eine primär-biliäre Zirrhose. Beide waren zur Zeit der Untersuchung im Stadium IV und sind inzwischen gestorben. Klinisch standen bei beiden Schwestern die Symptome der portalen Hypertension, der Cholestase und des posthämorrhagischen Eisenmangels im Vordergrund. Bei dem Vater der Zwillingsschwestern bestanden eindeutige anamnestische Hinweise auf das Vorliegen einer Lebererkrankung. Alle 13 Kinder der Schwestern sind gesund, und von 11 Kindern wurden uns vom DRK-Krankenhaus Seren überlassen. Über diese Familie ist schon 1977 von Lindner et al. berichtet worden (68).

2.2. Familie B

Familie B stammt aus Florenz und wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Gentilini, Florenz, untersucht. Der Stammbaum umfaßt drei Generationen. Mutter und zwei der drei Töchter sind an PBC erkrankt, die sieben Enkelkinder sind gesund. Auch Seren der Ehemänner der drei Töchter konnten wir auf Antikörper untersuchen.

2.3. Familie C

Die Patientin in Familie C aus der Medizinischen Klinik Tübingen befindet sich im Frühstadium der PBC. An Beschwerden gibt sie nur starken Juckreiz und Abgeschlagenheit an. Acht Geschwister, 14 Nichten und Neffen, die zwei eigenen Kinder, der Ehemann, ein Schwager und eine Schwägerin der Patientin konnten auf Antikörper untersucht werden. (Abb.29).

Die Patientin lebt im gleichen Haus wie die Familie ihrer Schwester (I/5). Sie gab an, außerdem engen Kontakt zu den Familien ihrer Schwestern I/1 und I/2 zu haben und auch häufig mit der Familie ihres Bruders I/4 zusammenzukommen, aber nur sehr selten mit der ihres Bruders I/10. Die Schwester I/12 lebt in Australien und kommt nicht oft nach Deutschland. Die Schwester I/2 lag 1983 wegen eines Apoplexes im Krankenhaus, der Bruder I/8 hat vor mehreren Jahren eine Hepatitis B durchgemacht, die Nichte II/8 ist häufig krank und leidet an Anämie. Alle anderen Angehörigen der Patientin sind gesund.

2.4. Familie D

Die Patientin in Familie D, Jg. 1957, hat eine PBC im Stadium II. Sie hat keine Geschwister, wir konnten

aber Seren ihrer Eltern, Onkel und Tanten, außerdem von sechs Freunden und Freundinnen auf Antikörper überprüfen. Alle untersuchten Personen waren gesund.

2.5. Familie E

Familie E (ebenfalls aus Tübingen) besteht aus Mutter, Ehemann und zwei Kindern der Patientin. Diese befindet sich ebenfalls im Frühstadium der PBC.

2.6. Familie F und G

Seren der Familien F und G schickte uns freundlicherweise Prof. Dr. med. H. Thaler, Wien, zu. In beiden Familien haben die Patientinnen eine PBC Stadium I/II. Alle Angehörigen sind gesund.

2.7. Familie H

Auch in der aus drei Generationen bestehenden Familie H befindet sich die Patientin, die zu den 94 Patienten des DRK-Krankenhauses, Hamburg, gehört im Stadium I der PBC. Mutter, Schwester und Tochter der Patientin sind gesund.

2.8. Familie I

Seren einer weiteren interessanten Familie wurden uns auf Betreiben der Patientin selbst aus den USA von Prof. R.R. Varma, Medical College of Wisconsin, zugesandt. Diese Familie wurde nicht in die Studie, die die Familien A-H umfaßt, aufgenommen, da wir zu wenig klinische Angaben haben. Der Stammbaum ist nur als solcher mit unseren serologischen Ergebnissen in Seren von zwei Geschwistern und drei Nichten der Patientin dargestellt. (Abb.34).

3. Seren von Patienten mit antimitochondrialen Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten

Als AMA positive Kontrollen dienten Serumproben von Patienten mit Syphilis II (Anti M 1; 116), Pseudolupus Syndrom (Anti M 3; 42), chronisch cholestatischer Hepatitis (Anti M 4, nur in Assoziation mit Anti M 2; Mischform; 18), ANA negativen Kollagenosen (Anti M 5; 63), Iproniazid induzierter Hepatitis (Anti M 6; 50), verschiedenen Formen von Kardiomyopathien (Anti M 7; 60) und progressiv verlaufender PBC (Anti M 8, nur in Assoziation mit Anti M 2 vorkommend; 17).
Anti M 5 und Anti M 6 Seren überließ uns freundlicherweise Dr. J. Homberg (Hôpital Saint-Antoine, Paris). Seren von Patienten mit verschiedenen Formen der Kardiomyopathie stellte uns Dr. B. Maisch, Universität Würzburg, zur Verfügung.

Die verschiedenen Antigene testeten wir mit je einem hochtitrigen Serum aus jeder Gruppe (Anti M 1 - Anti M 8) als Marker aus, sowie mit einem Serum, das Antikörper gegen Mikrosomen aus Leber und Niere hatte (Anti LKM; 88).

4. Patienten mit AMA negativen Erkrankungen

Als AMA negative Kontrollen verwendeten wir Seren von 100 Blutspendern sowie von 793 Patienten mit verschiedenen Erkrankungen: Autoimmune CAH (n=47, davon 35 mit Leber-Pankreas-spezifischen Antikörpern; 16), akute und chronische virale Hepatitis (n=72), kryptogene Zirrhose (n=25), primär sklerosierende Cholangitis (n=10), alkoholische Lebererkrankung (n=25), Morbus Wilson (n=5), Haemochromatose (n=3), Kollagenerkrankungen (n=117), organspezifische und -unspezifische Autoimmunerkrankungen (n=107), Herzerkrankungen (n=311)

und anderen Krankheiten (Colonkarzinom, Lymphome, Plasmozytom, Innenohrschwerhörigkeit, Hypertonie etc., n=165).

5. Laborpersonal

Wir untersuchten auch Seren von 16 Angestellten eines immunpathologischen Labors, die häufig mit Seren von PBC Patienten in Kontakt kamen, sowie von 29 medizinisch-technisch Angestellten (MTA) aus anderen Labors auf Antikörper.

Von allen 16 MTA des immunpathologischen Labors konnten wir mehrere Seren im Verlauf testen, aber nur von 3 MTA standen uns Seren vom Beginn ihrer Arbeit in dem Labor an zur Verfügung.

Zwei davon arbeiten seit 1981 in dem immunpathologischen Labor. Die dritte MTA war von 1975-78 in dem Labor tätig. 7 Seren aus dieser Zeit und ein Serum 6 Jahre nachdem die MTA das Labor verlassen hatte, konnten auf Antikörper getestet werden.

II. Methoden

1. Antigene

1.1. Mitochondrien

Mitochondrien wurden aus Rinderherz nach der Methode von Smith (103) und aus Rattenleber, -magen, -lunge, -skelettmuskel, Schweineniere, -milz, Rinderleber, Rinderpankreas, humaner Leber und braunem Fettgewebe von Kaninchen in Anlehnung an die Methode von Berg et al. (12) isoliert und in einer Konzentration von 40-50mg Protein/ml (in TSE-Puffer: 0,25M Saccharose, 10mM Tris-sulphat, 10mM EDTA, pH 7,4) 8 Tage bei -20°C aufbewahrt. Die Lebermitochondrien mußten sofort weiter verarbeitet werden.

1.1.1. SN 40

Der Überstand nach Abzentrifugieren der Mitochondrien (SN 40, 138 000g) aus Rinderherz, Rattenleber, -magen, -lunge, -skelettmuskel, Schweineniere, Schweinemilz, Rinderleber, Rinderpankreas, humaner Leber und braunem Fettgewebe von Kaninchen (12) wurde ebenfalls bei -20°C eingefroren.

1.2. Submitochondriale Partikel (SMP)

Die Mitochondrien wurden in TSE-Puffer resuspendiert, nach Einstellung einer Proteinkonzentration von 10mg/ml in Fraktionen von 15ml mit einem Bronson B-12 Sonifier, Stufe 6, in vier bzw. fünf (Lebermitochondrien) Intervallen zu je 30 sec. beschallt (92) und bei -20°C aufbewahrt.

Aus den beschallten Mitochondrien aus Rinderherz, Schweineniere, humaner Leber, Ratten-und Rinderleber erhielt man submitochondriale Partikel (SMP) durch Zentrifugation zunächst für 10min bei 13 000g, um größere Membranfragmente zu beseitigen, und anschließend für 30min bei 100 000g. Das Pellet, die SMP, mußten resuspendiert, homogenisiert und dreimal gewaschen werden, bevor sie in einer Konzentration von 20-30mg Protein/ml bei -20°C eingefroren wurden.

1.2.1. SMP-SN

Der Überstand nach der ersten Zentrifugation der beschallten Mitochondrien bei 100 000g (SMP-SN) wurde ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

1.3. Neurospora crassa

Die Isolierung von Antigenen aus Neurospora crassa Mitochondrien erfolgte nach der Methode von Stolpmann und Berg (105).

1.4. ATPase

ATPase wurde aus submitochondrialen Partikeln von Rinderherz nach der Methode von Beechey et al. (9) isoliert und weiter gereinigt nach der Beschreibung von Lindenborn-Fotinos et al. (66) und aus SMP von Rattenleber nach der Methode von Tyler und Webb (110).

Zu Herz SMP, die in TSE-Puffer resuspendiert und auf 5mg Protein/ml verdünnt worden waren, gab man die Menge Chloroform, die der Hälfte des Volumens dieser Suspension entsprach. Nachdem beide Phasen 30 sec. heftig in einem Whirlimixer gemischt und anschließend durch Zentrifugation bei 300g getrennt worden waren, wurde die

wässrige Phase, die ATPase enthält, sorgfältig abgenommen, 30 min. bei 100 000g zentrifugiert und auf eine Proteinkonzentration von ca. 1mg/ml in einer Berghof-Ultrafiltrationszelle eingeengt.

Leber SMP verdünnte man mit TSE-Puffer + 4mM ATP, pH 7,6, auf 6mg/ml, versetzte sie ebenfalls mit dem halben Volumen an Chloroform und zentrifugierte sie bei 300g. Die wäßrige Phase mußte vor der Zentrifugation bei 100 000g zunächst noch mit ATP-haltigem TSE-Puffer im Verhältnis 1:1 verdünnt werden.

Die ATPase beider Organe wurde bei -20°C aufbewahrt.

1.5. Innere und äußere Mitochondrienmembranen (inner and outer membranes), Mikrosomen

Innere und äußere Mitochondrienmembranen (inner and outer membranes) sowie Mikrosomen aus Rattenleber wurden nach der Methode von Schnaitman und Greenawalt (96) isoliert.

1.6. Plasmamembranen

Die Präparation von Plasmamembranen aus Rattenhepatozyten erfolgte nach der Methode von Behrens und Hollander (10) und Ray (85).

1.7. Cardiolipin

Gereinigtes Cardiolipin aus Rinderherz erhielten wir von der Firma Serva, Heidelberg.

2. Enzymmarker

Die verschiedenen subzellulären Fraktionen wurden mit Hilfe von Enzymmarkern für Mikrosomen, äußere und innere Mitochondrienmembranen und Plasmamembranen auf ihre Reinheit überprüft. Wir bestimmten die Succinat-Cytochrom C Reduktase als Marker für innere Mitochondrienmembran (104), die Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom C Reduktase als Marker für äußere Mitochondrienmembranen (104), die Glucose-6-Phosphatase als Marker für Mikrosomen (7) und die 5'Nucleotidase als Marker für Plasmamembranen (79).

3. Isolierung von Antigenen aus SMP-SN durch Säulenchromatographie

Die Überstände, die man nach Zentrifugation von beschallten Mitochondrien aus Rinderherz, Schweineniere, Rattenleber, humaner Leber und Rinderleber bei 100 000g erhielt (s. 1.2.1.) wurden auf eine Sepharose 6B Säule (1,6 x 90cm) aufgetragen (Konzentration jeweils ca. 15mg/ml, Volumen 12 ml) und in TSE-Puffer eluiert in 6ml Fraktionen. Die drei Peak, die man erhielt, wurden einzeln gepoolt, eingeengt in einer Berghof-Ultrafiltrationszelle und im ELISA gegen bestimmte Marker Seren ausgetestet.

4. Trennung mitochondrialer Antigene durch Sucrose-Dichtegradienten

Die Gradientenstufen, die verwendet wurden, hatten die folgenden Dichten und Sucrose-Konzentrationen: 1.04 (10%), 1.08 (20%), 1.10 (24%), 1.12 (29%), 1.14 (34%), 1.16 (38%), 1.19 (43%), 1.24 (52%) und 1.28 (59%).

Je 2ml der SN 40 Fraktionen aus Rinderherz, Schweineniere und Rattenleber wurden auf die Gradienten gelegt (ca. 15mg Protein) und 20h bei 100 000g mit einem Beckmann SW 40 Rotor zentrifugiert (92).

Die Fraktionen wurden sorgfältig abgehoben und mit Hilfe von Marker Seren im ELISA auf ihre Antigenaktivität getestet.

5. Behandlung der Antigene mit verschiedenen Enzymen

Die Antigene wurden nach der Methode von Sayers et al. (92) mit Trypsin, Nagarse, DNAase und RNAase sowie mit Lipase behandelt.

5.1. Trypsinbehandlung

SMP von Rinderherz und Rattenleber wurden mit Tris-Cl Puffer (20mM Tris-Cl, 12mM $CaCl_2$, pH 7,8) auf 1mg/ml verdünnt und mit Trypsin in verschiedenen Konzentrationen 30min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen in der Menge, die der doppelten Trypsinkonzentration entsprach, wurde die Reaktion gestoppt.

Als Kontrolle dienten SMP, die mit Trypsin, das schon mit Trypsin-Inhibitor 5min. reagiert hatte, ebenfalls 30min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert worden waren.

Das Trypsin mußte zunächst in 0,001 n HCl gelöst werden. Anschließend wurde es den Proben in den Konzentrationen 50 µg, 100 µg und 200 µg pro mg Protein zugegeben.

Behandlung der SMP von Schweineniere erfolgte mit 100µg Trypsin/mg Protein, von ATPase aus Rinderherz mit 50µg, 100µg und 200µg Trypsin/mg Protein.

5.2. Nagarsebehandlung

5 mg Nagarse, eine Protease aus Bacillus subtilis, wurden in 1 ml TSE-Puffer gelöst und den SMP aus Rinderherz und Rattenleber in den Konzentrationen 25µg, 50µg, 100µg, 200µg und 500µg/mg Protein zugegeben. Die Kontrolle versetzte man nur mit TSE-Puffer.

Nach Inkubation für 30min. bei 30°C im Wasserbad mußte die Reaktion durch Zentrifugation bei 100 000g für 30min. gestoppt werden, um die Nagarse zu entfernen, da es keinen Inhibitor für dieses Enzym gibt. Das Pellet wurde zweimal mit TSE-Puffer gewaschen, um das Enzym vollständig zu entfernen.

Behandlung der Nieren SMP sowie der SMP aus Rinder- und humaner Leber erfolgte mit 25µg Nagarse/mg Protein.

5.3. Behandlung mit DNAase I, RNAase A und Lipase

Herz- und Leber SMP wurden in einer Konzentration von 2mg/ml mit 100µg DNAase I bzw. RNAase A oder Lipase pro mg Protein 30min. bei 30°C im Wasserbad inkubiert.

Für die RNAase Behandlung mußten die SMP mit 15mM PBS, pH 7,4, für die DNAase Behandlung mit 15mM PBS + 40mM $MgSO_4$ (pH 7,4) und für die Lipase Behandlung mit 0,15M Tris-Puffer + 0,075M $CaCl_2$ (pH 7,0) verdünnt werden.

Die Reaktion wurde durch Beseitigung der Enzyme durch Zentrifugation bei 100 000g gestoppt. Zur Kontrolle war je einer Fraktion SMP nur der jeweilige Puffer ohne Enzym zugegeben worden.

Das Pellet nach der Zentrifugation wurde zweimal gewaschen.

6. Absorptionen von verschiedenen Seren mit unterschiedlichen submitochondrialen Fraktionen

Seren von 3 der 171 Patienten mit PBC aus dem DRK-Krankenhaus Hamburg bzw. der Heinz-Kalk-Klinik Bad Kissingen (Anti M 2 positiv), einem Patienten mit PLE (Anti M 3), einem Patienten mit Mischform (Anti M 2 + Anti M 4), einem Patienten mit Iproniazid induzierter Hepatitis (Anti M 6) und von einer Normalperson als Kontrolle wurden mit SMP aus Rinderherz, Rattenleber und Schweineniere absorbiert und als Kontrolle nur mit TSE-Puffer versetzt.

Die Absorption erfolgte mit 25-30mg Protein pro ml Serum zunächst 30min. bei Raumtemperatur, anschließend für 48 h bei 4°C auf einer Drehscheibe. Nach dieser ersten Absorption wurden die SMP 30min. bei 100 000g abzentrifugiert und der Überstand wieder mit derselben SMP-Menge versetzt. Insgesamt wurde jedes Serum mit jedem Antigen dreimal absorbiert.

Die Seren, die nach der dritten Absorption 1:8 verdünnt waren, wurden im ELISA in einer Endverdünnung von 1:500 auf noch vorhandene Antikörper gegen die verschiedenen submitochondrialen Fraktionen getestet.

7. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen der verschiedenen Antigenfraktionen wurde nach der Methode von Bradford (20) durchgeführt.

8. Methoden zum Nachweis von Autoantikörpern, insbesondere von antimitochondrialen Antikörpern in Patientenseren

8.1. Nachweis von Autoantikörpern im Immunfluoreszenztest

Für den Immunfluoreszenztest (IFL) nach der Methode von Mackay und Ritts (72) wurden Patientenseren 1:10 verdünnt und mit 4-5µm dicken Gefrierschnitten von Rattenherz, -leber, -niere und -magen und menschlicher Niere und Schilddrüse inkubiert. Antikörper gegen diese Organe in den Patientenseren konnten durch Fluoreszeinkonjugierte Antikörper der Ziege, die gegen humanes IgG, IgM und IgA gerichtet waren, nachgewiesen werden.

Autoantikörper gegen Mitochondrien wurden durch eine positive zytoplasmatische Immunfluoreszenz an proximalen und distalen Tubuluszellen der Niere, an Parietalzellen des Magens, an Hepatozyten sowie an Epithelzellen der Schilddrüse bestimmt.

Auf das gleichzeitige Vorliegen von Autoantikörpern gegen Kerne (ANA), glatte Muskulatur (SMA), Fibrillen (AFA) und gegen Gefäßendothel (AEA) wurde im gleichen Testansatz geachtet.

8.2. Nachweis von AMA in der Komplementbindungsreaktion

Die Komplementbindungsreaktion (KBR) wurde nach der Methode von Mackay und Ritts (72) mit SN 40 aus Schweineniere und Rattenleber in einer Konzentration von 100µg/ml, mit SMP von Rinderherz und Rattenleber in einer Konzentration von 80 bzw. 100µg/ml und mit ATPase in einer Konzentration von 50µg/ml durchgeführt.

8.3. Nachweis von AMA im Immundiffusionstest

Der Immundiffusionstest (ID) erfolgte nach der Beschreibung von Miyachi et al. (80) mit beschallten Rattenleber- und Schweinenieremitochondrien als Antigenen in einer Konzentration von 40mg/ml. Agarose wurde in einer Konzentration von 0,4% verwendet.

8.4. Nachweis von AMA im fluorometrischen Immunoassay (FIAX)

Prinzip und Aufbau der Methode zum Nachweis von AMA im FIAX wurden von Klein et al. beschrieben (59).

8.5. Nachweis von AMA im ELISA

Der Aufbau des Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von AMA in Patientenseren erfolgte mit der Beschreibung von Engvall (29) als Basis in derselben Weise, wie sie für die FIAX Methode beschrieben wurde (59).

Zur Standardisierung des Tests wurden drei Seren mit unterschiedlichen AMA Titern und ein AMA negatives Serum verwendet.

8.5.1. Prinzip des ELISA

Mikrotiterplatten (immuno plates) werden mit Antigenen 16 h bei 4°C inkubiert und anschließend mit Phosphate Buffered Saline (PBS), 60mM, pH 7,4, + 0,5% Rinderalbumin (BSA) zur Abdeckung noch freier Bindungsstellen dreimal gewaschen. Nach Inkubation für 90min bei Raumtemperatur mit den Serumproben, die auf Antikörper untersucht werden sollen, werden die Platten dreimal gewaschen mit PBS + 0,5% BSA + 0,2% Triton X 100, um un-

gebundene Proteine zu entfernen. Triton X 100, ein Detergens, verhindert unspezifische Bindungen. Monovalente Peroxidase-konjugierte antihuman IgG, IgM und IgA Antikörper der Ziege werden für 60 min zugegeben. Die Mikrotiterplatten werden nochmals mit PBS + 0,5% BSA + 0,2% Triton X 100 gewaschen. Die Enzymreaktion wird durch Zugabe von Substrat, o-Phenylendiamin, gestartet, und nach 20 min mit 25%iger H_2SO_4 abgestoppt. Die Absorptionen werden im Microelisa^R Auto reader gemessen und als ΔA/min angegeben.

8.5.2. Standardisierung

Zur Standardisierung des ELISA zum Nachweis von AMA wurden die Antigenkonzentrationen, die Serum- und die Antiserumverdünnungen austitriert.

8.5.2.1. Antigenkonzentration

Die Antigene wurden mit 0,2M Bicarbonatpuffer, pH 9,6, verdünnt. Jedes Loch der Mikrotiterplatte wurde mit 100µl der Suspension gefüllt.

Um eine optimale Antigenkonzentration herauszufinden, wurde eine Verdünnungskurve von 2mg Protein/ml bis 1,75µg Protein/ml für jedes Antigen aufgestellt.

Die Antigenkonzentration, bei der man die beste Differenzierung zwischen dem schwach positiven und dem negativen Serum erhielt, galt als geeignet. Die Konzentration für jedes Antigen ist aus Tabelle 2 ersichtlich.

8.5.2.2. Serumverdünnung

Für jedes Antigen mußte die beste Serumverdünnung gefunden werden. Hierzu wurden die vier Markerseren mit 60mM PBS + 0,125% BSA + 0,1% Triton X 100 verdünnt von 1:20 bis 1:20480. Die Verdünnung, bei der die unspezifischen Signale am geringsten und die Differenzierung schwach positiv - negativ am besten war, wurde in künftigen Tests verwendet (Tabelle 2).

Tabelle 2 Antigenkonzentrationen und Serumverdünnungen zum Nachweis von AMA in Patientenseren im ELISA

Antigenfraktionen	Antigenkonzentration(µg/ml)	Serumverdünnung
1. SN 40 (aus allen Organen)	10	1: 500
2. SMP		
a) Rinderherz		
unbehandelt	50	1:4000
Nagarse behandelt	50	1:2000
b) Schweineniere		
unbehandelt	30	1:2000
Nagarse behandelt	30	1:2000
c) Ratten-, Rinder- und humane Leber		
unbehandelt	20	1: 500
Nagarse behandelt	20	1: 500
3. ATPase aus Rinderherz	5	1:4000
Rattenleber	10	1: 500
4. inner and outer membranes, Plasmamembranen, Mikrosomen	10	1: 500
5. andere Antigene (Dichtegradienten, Säulenchromatographie etc.)	10	1: 500

8.5.2.3. Verdünnung der Peroxidase konjugierten antihuman Antikörper

Für die monovalenten Peroxidase konjugierten antihuman IgG, IgM und IgA Antikörper von der Ziege (Fa. Medac, Hamburg) wurden ebenfalls Verdünnungsreihen aufgestellt. Bei Chargen mit den Enzymkonjugationen 96 000 units/ml lag die Verdünnung, bei der man die höchsten spezifischen und die niedrigsten unspezifischen Signale erhielt, bei 1:2000 (die Verdünnung erfolgte mit PBS, 60mM + 0,5% BSA + 0,2% Triton X 100).

Die Verdünnung aller weiteren Chargen mit geringeren Enzymkonjugationen mußte dementsprechend umgerechnet werden.

8.5.2.4. Substrat

Das Substrat, o-Phenylendiamin, wurde, wie bei Engvall beschrieben (29), in einer Konzentration von 0,5mg/ml in 0,1M Citratpuffer, pH 5,0 mit Zusatz von 0,01% H_2O_2 gelöst.

8.5.2.5. Reproduzierbarkeit und Validität sowie Standardisierung des Nachweises von AMA im ELISA

Ebenso wie für die FIAX-Methode wurde für den Nachweis von AMA im ELISA der Intra- und Interassayvariationskoeffizient berechnet, indem drei Seren zehnmal in demselben Assay bzw. in zehn aufeinanderfolgenden Assays getestet wurden (59).

Der Intraassayvariationskoeffizient lag bei 6%, der Interassayvariationskoeffizient bei 11% für schwach positive und bei 5% für hoch positive Seren.

Bei der routinemäßigen Durchführung müssen in jedem Test vier Seren mit unterschiedlichen Titern als Eichseren mitgeführt werden.

Für jedes Serum werden Doppelbestimmungen durchgeführt. Um eine Grenze zwischen negativen und positiven Seren ziehen zu können, wurden für jedes Antigen Seren von 50 Normalpersonen auf IgG, IgM und IgA Antikörper getestet. Aus den Extinktionen dieser 50 Seren wurden der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung s errechnet. Werte, die über $\bar{x} + 3s$ lagen, galten als eindeutig, Werte zwischen $\bar{x} + 2s$ und $\bar{x} + 3s$ als grenzwertig positiv. Werte unter $\bar{x} + 2s$ wurden als negativ bewertet.

9. Nachweis von Rheumafaktoren

Rheumafaktor-Titer in Patientenseren wurden mit Hilfe des "FIAX Test Kit for Rheumatoid Factor (IgM)" (IDT) bestimmt.

10. Quantitative Immunglobulinbestimmung in Patientenseren

Die Bestimmung der IgG, IgM und IgA Spiegel in Patientenseren erfolgte mit Hilfe der FIAX Test Kits (IDT) sowie der radialen Immundiffusion nach Mancini et al. (76) unter Verwendung von Tri-Partigen^{R} Immundiffusionsplatten (Behring).

11. Hepatitisserologie

Die Hepatitisserologie auf HBsAg, anti HBs, anti HBc, HBeAg und anti HBe wurde mit dem ELISA Test Kit von Abbott durchgeführt.

12. Bestimmung verschiedener Laborwerte

Zur Bestimmung von GOT, GPT, alkalischer Phosphatase (AP), Bilirubin und γ- Globulinen in Patientenseren und Seren von Angehörigen von PBC Patienten wurden die üblichen Labormethoden angewendet.

13. Statistische Berechnungen

Mittelwerte ($\bar{x}$), Standardabweichungen (s), Korrelationskoeffizienten (r) und Regressionsgeraden (m = Steigung, b = Achsenabschnitt) wurden mit Hilfe eines TI - S1 - III Computers (Texas Instruments) ermittelt.

C. ERGEBNISSE

1. Hinweis auf das Vorkommen organspezifischer Antikörper gegen Lebermitochondrien beim Testen von PBC Seren auf Anti M 2 Antikörper im ELISA

Seren von 94 Patienten mit histologisch gesicherter PBC (61) wurden im ELISA gegen beschallte Mitochondrien, Nagarse-behandelte und unbehandelte SMP aus Rinderherz, Schweineniere und Rattenleber sowie gegen die ATPase Fraktion und den SMP-SN aus Rattenleber und Rinderherz getestet (Tabelle 3).

Tabelle 3 Reaktion von 94 PBC Seren mit verschiedenen mitochondrialen Antigenfraktionen

Antigenfraktionen	Anzahl (%) Seren AMA positiv gegen Antigene aus		
	Rinderherz	Rattenleber	Rinderherz+ Rattenleber
Beschallte Mitochondrien	92 (98)	93 (99)	94 (100)
SMP unbehandelt	92 (98)	68 (72)	94 (100)
Nagarse behandelt	10 (11)	45 (48)	45 (48)
ATPase	90 (96)	0	90 (96)
SMP-SN	90 (96)	88 (94)	91 (97)

92 der 94 Seren (98%) waren positiv, wenn sie gegen beschallte Mitochondrien oder unbehandelte SMP aus Rinderherz oder Schweineniere getestet wurden. 93 Seren (99%) reagierten mit beschallten Mitochondrien aus Rattenleber, aber nur 68 (72%) hatten Antikörper gegen unbehandelte Leber SMP (Tab. 3).

Mit der ATPase Fraktion aus Rinderherz (M 2 enthaltend) zeigten 90 Seren (96%) eine positive Reaktion, keines der Seren reagierte dagegen mit der ATPase Fraktion aus Rattenleber.

Testete man die 94 Seren gegen Nagarse behandelte SMP aus Rinderherz und Rattenleber, so reagierten 45 (48%) mit einem Nagarse insensitiven Antigen an Leber SMP, aber nur 10 (11%) mit einem Nagarse insensitiven Antigen an Herz SMP.

Zwei der vier Anti M 2 negativen Seren reagierten nur mit Nagarse behandelten und unbehandelten Leber SMP und beschallten Lebermitochondrien, nicht jedoch mit Antigenfraktionen aus Rinderherz oder Schweineniere.

Die Streuungen der Extinktionen (ΔA), die man erhält, wenn man die 94 Seren gegen unbehandelte Herz SMP und gegen M 2 testet, ist in Abb. 1 dargestellt.

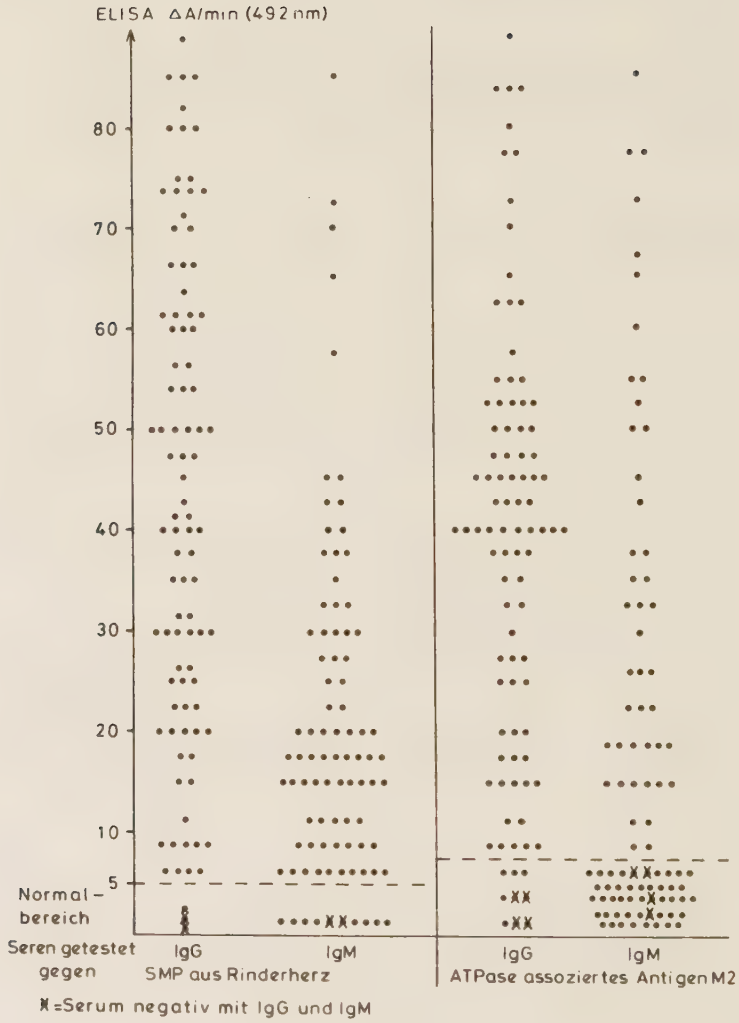

Abb. 1 Antikörperaktivitäten von 94 PBC Seren mit SMP und dem M 2 Antigen aus Rinderherz im ELISA

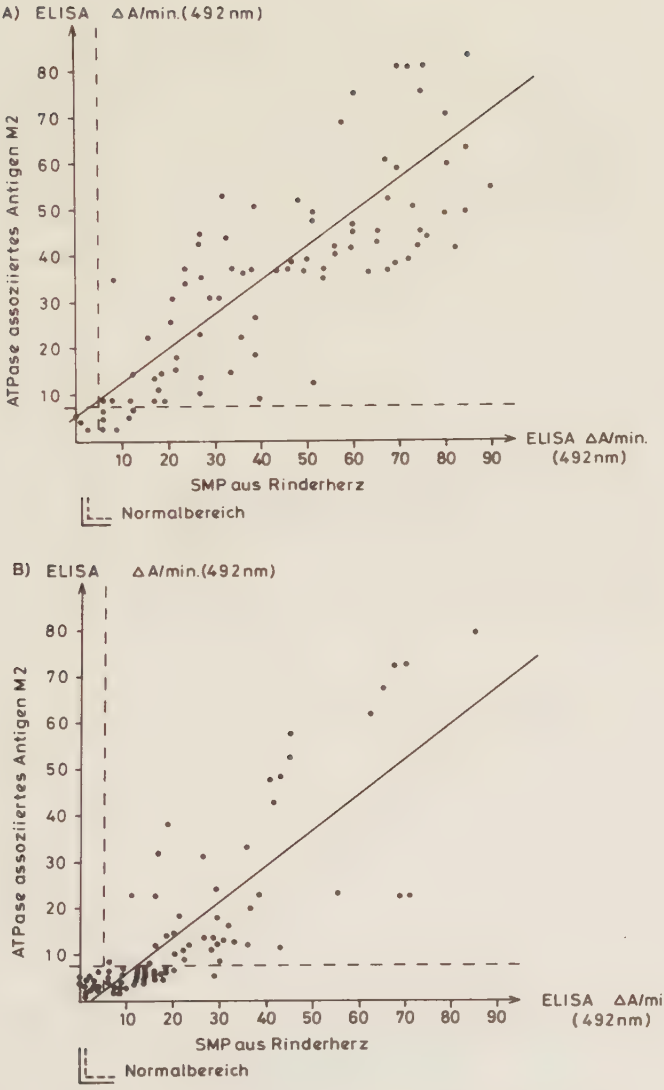

Abb. 2 Korrelation zwischen den Antikörperaktivitäten von 94 PBC Seren mit SMP und dem M 2 Antigen aus Rinderherz
A) für Antikörper vom IgG Typ (r=0,8; m=0,7; b=7)
B) für Antikörper vom IgM Typ (r=0,8; m=0,79; b=-2)

Vergleicht man die Extinktionen (ΔA) im Test mit Herz-SMP mit denen des M 2-Tests, so erhält man eine gute Korrelation von 0,8 für Antikörper vom IgG und IgM Typ. Dies weist darauf hin, daß PBC Seren an Herz SMP dasselbe Antigen erkennen wie in der M 2 Fraktion (Abb. 2A und B). Es gibt allerdings auch Seren, die keine Antikörper gegen M 2 haben, jedoch mit Antikörpern vom IgM Typ mit Herz SMP reagieren (Abb. 2B).

Gute Korrelationen erhält man auch, wenn man die Antikörperaktivitäten mit Herz- und Nieren SMP vergleicht ($r = 0,78$ für IgG und 0,67 für IgM Antikörper, vgl. Abb. 3A und B).

Im Gegensatz dazu findet man keine Korrelation zwischen den Extinktionen, die man im Test mit Herz- und Leber SMP erhält ($r = -0,02$ für IgG und 0,2 für IgM Antikörper, vgl. Abb. 4A und B)

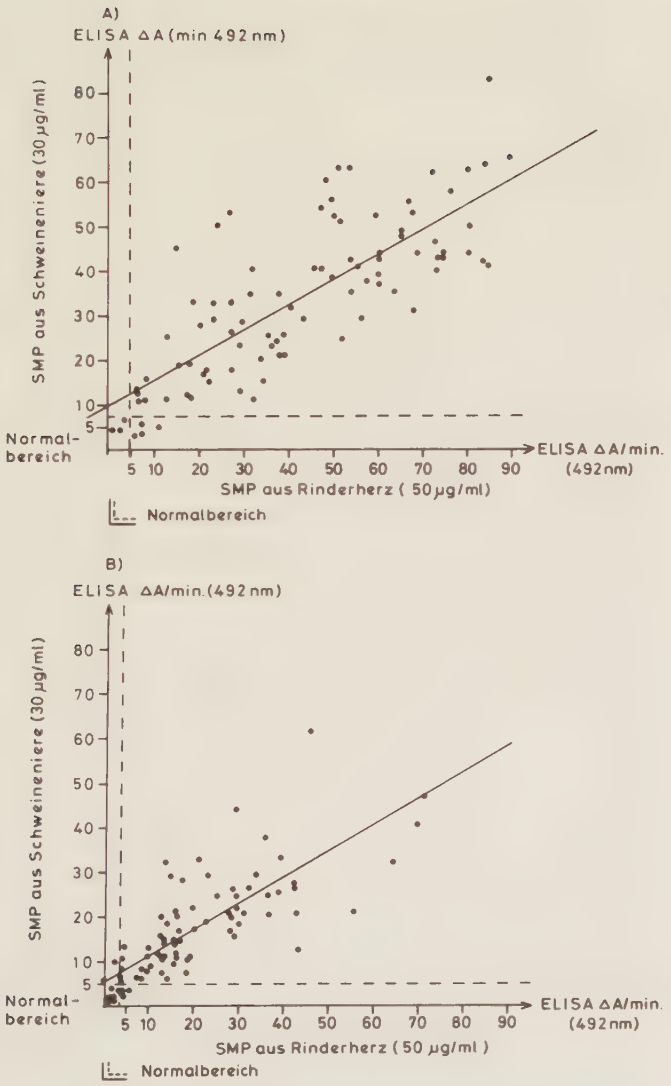

Abb. 3 Korrelation zwischen der Antikörpertitern von 94 PBC Seren mit SMP aus Rinderherz und Schweineniere im ELISA
A) für Antikörper vom IgG Typ (r=0,78;m=0,61;b=10)
B) für Antikörper vom IgM Typ (r=0,67;m=0,60;b=6,1)

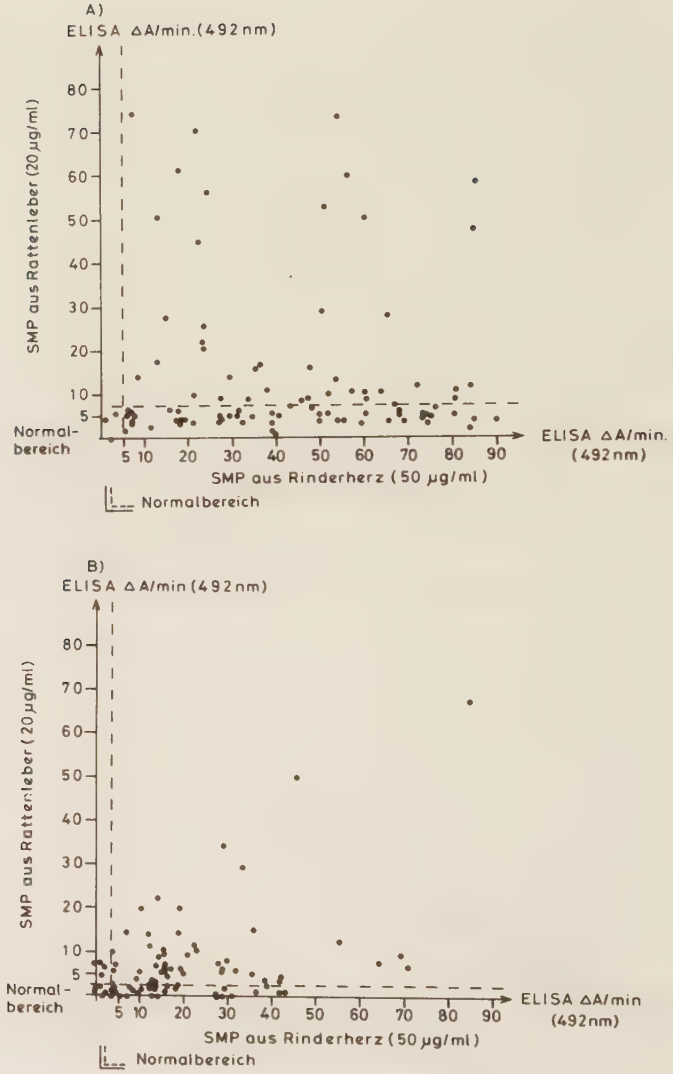

Abb. 4 Korrelation zwischen den Antikörperaktivitäten von 94 PBC Seren mit SMP aus Rinderherz und Rattenleber
A) für Antikörper vom IgG Typ (r = -0,02)
B) für Antikörper vom IgM Typ (r = 0,20)

Auch die Antikörperaktivitäten mit unbehandelten und Nagarse behandelten Herz SMP korrelieren nicht, da das M 2 Antigen durch Proteasen zerstört wird.

Diese Befunde deuten darauf hin, daß Herz- und Nieren SMP ähnliche Antigendeterminanten besitzen, wobei die Hauptkomponente das M 2 Antigen ist. Dieses befindet sich dagegen nicht mehr an den Leber SMP.

Testet man aber die Seren gegen den SMP-SN aus Rattenleber, so zeigt sich, daß dieser das M 2 Antigen enthält, wodurch auch die gute Korrelation von r=0,88 zwischen den Antikörperaktivitäten mit M 2 aus Rinderherz und dem SMP-SN aus Rattenleber bedingt ist (nicht dargestellt). Durch das Beschallen der Lebermitochondrien scheint sich das M 2 Antigen von der Membran zu lösen, während es bei Beschallen von Herz- und Nierenmitochondrien zum größten Teil noch an die Membran gebunden bleibt.

Dafür spricht auch, daß die PBC Seren keine Reaktion mit der aus Leber SMP durch Chloroform extrahierten ATPase Fraktion zeigen, während die Enzymaktivität in dieser Fraktion deutlich meßbar war.

Da es aber dennoch einige Seren gibt, die eine hohe Aktivität mit Leber SMP aufweisen, müssen diese eine weitere Antigendeterminante besitzen. Es besteht eine gute Korrelation zwischen den Antikörpertitern mit unbehandelten und Nagarse behandelten Leber SMP (r=0,92 für IgG und 0,93 für IgM Antikörper), so daß man annehmen kann, daß dieses Antigen an Leber SMP nicht durch die Nagarsebehandlung zerstört wird (Abb. 5A und B). Aus Abb. 5 geht auch hervor, daß alle Seren, die einen hohen Titer gegen Leber SMP aufweisen, mit der insensitiven Determinante reagieren, während es unter den den niedrigtitrigen Seren auch solche gibt, die mit einer sensitiven Determinante reagieren.

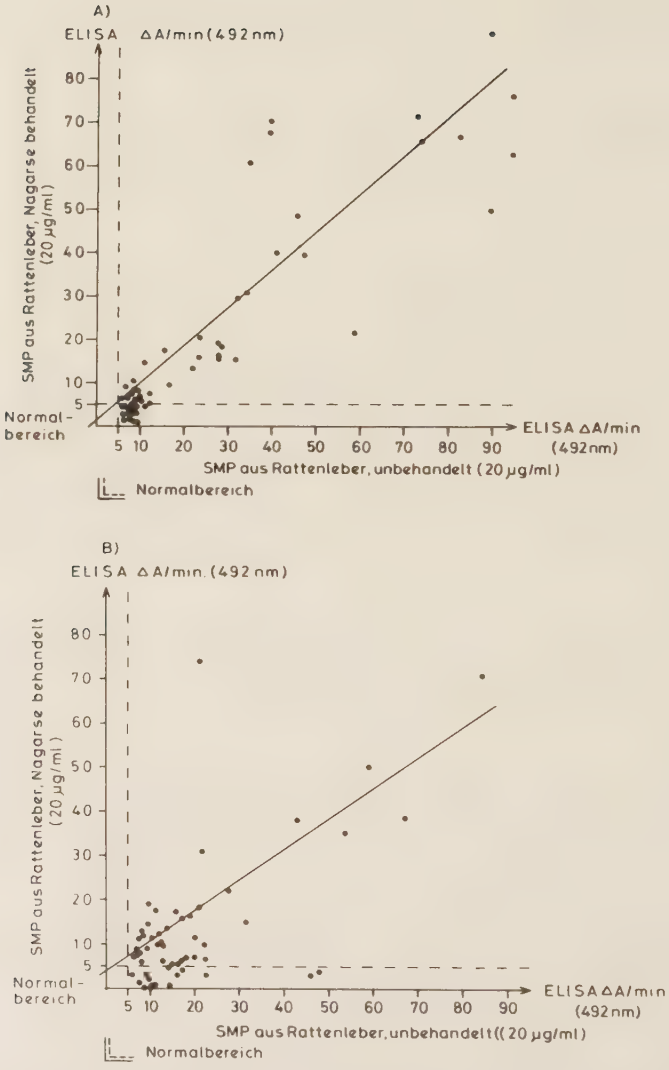

Abb. 5 Korrelation zwischen den Antikörpertitern von 68 PBC Seren, die mit unbehandelten Leber SMP reagieren, mit unbehandelten und Nagarse behandelten Leber SMP im ELISA
A) für Antikörper vom IgG Typ (r=0,92; m=0,86; b=1,2)
B) für Antikörper vom IgM Typ (r=0,93; m=0,63; b=4,2)

In Abb. 6 ist die Streuung der Antikörperaktivitäten gegen Nagarse behandelte Leber SMP und Herz SMP dar-

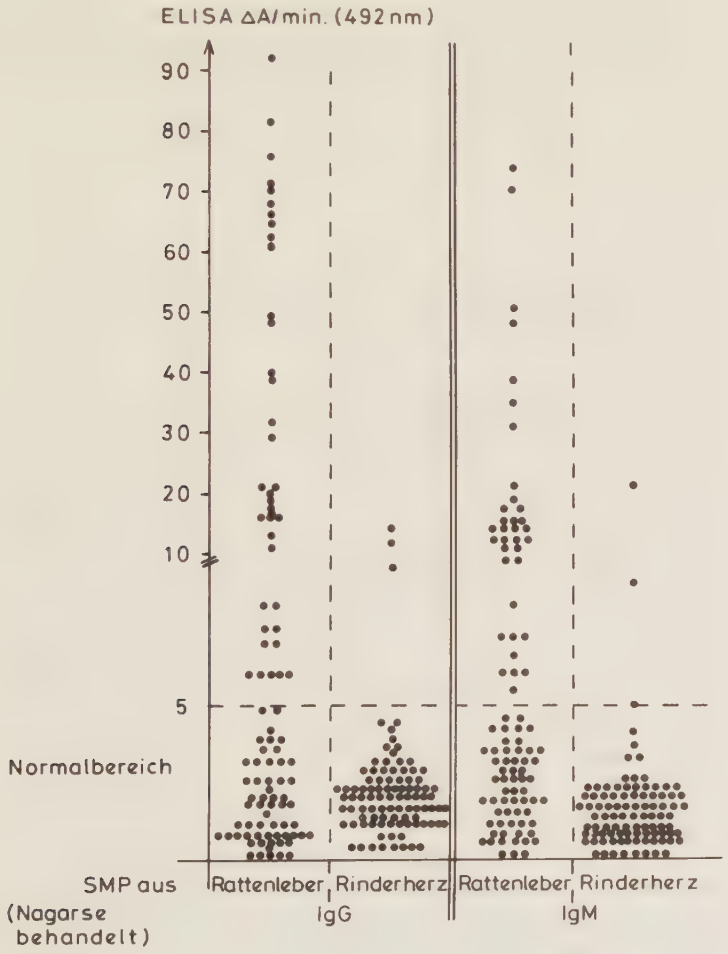

Abb. 6 Streuung der Antikörperaktivitäten von 94 PBC Seren mit Nagarse behandelten Leber und Herz SMP für Antikörper vom IgG und IgM Typ.

gestellt. Auch hieraus wird deutlich, daß Leber SMP eine Antigendeterminante besitzen, die an Herz SMP nicht zu finden ist.

Diese Beobachtungen weisen darauf hin, daß es in Seren von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose außer den für die Diagnose bedeutsamen Anti M 2 Antikörpern noch weitere antimitochondriale Antikörper geben muß. Um diese näher charakterisieren zu können, wurden Absorptionsstudien durchgeführt.

2. Nachweis von organspezifischen Antikörpern gegen Lebermitochondrien in PBC Seren durch Absorptionsstudien

Seren von 3 Patienten mit PBC (Anti M 2 positiv), einem Patienten mit Mischform (Anti M 2 + Anti M 4), einem Patienten mit PLE (Anti M 3), einem Patienten mit Iproniazid induzierter Hepatitis (Anti M 6) und einer gesunden Normalperson als Kontrolle wurden mit SMP aus Rinderherz, Rattenleber und Schweineniere absorbiert und anschließend im ELISA gegen verschiedene mitochondriale Fraktionen aus mehreren Organen getestet. Die Seren wurden nur auf Antikörper vom IgG Typ untersucht.

2.1. Normalserum

Das Normalserum zeigte weder vor noch nach der Absorption mit Herz-,Leber- oder Nieren SMP eine positive Reaktion mit einer der mitochondrialen Antigenfraktionen. Seine "Titer" im ELISA galten als Anhaltspunkt für die Bewertung der absorbierten Patientenseren als positiv oder negativ.

2.2. Absorption des Anti M 3-Serums

Anti M 3 Antikörper sind organunspezifisch und gegen die äußere Mitochondrienmembran gerichtet. Wie Abb.7 zeigt, konnten die Antikörper, die gegen eine Nagarse insensitive Antigendeterminante gerichtet sind, mit Herz-, Leber- und Nieren SMP absorbiert werden, d.h.

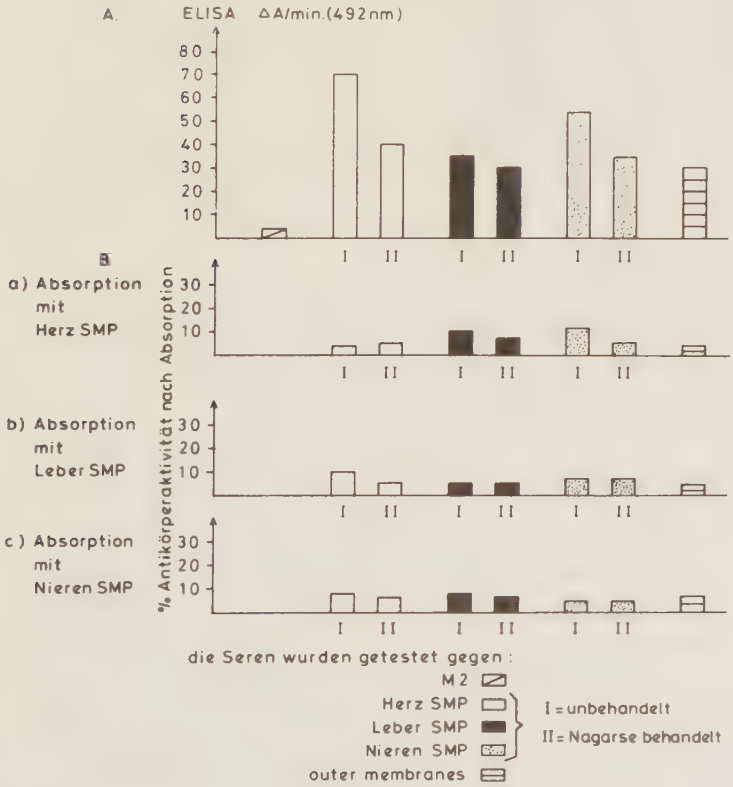

Abb.7 A. Antikörperaktivitäten eines Anti M 3-Serums mit verschiedenen Antigenfraktionen
B. Absorption des Anti M 3-Serums mit Herz- (a), Leber-(b) und Nieren SMP (c)

die SMP bestehen nicht nur aus innerer Mitochondrienmembran, sondern sind mit Fragmenten der äußeren Membran kontaminiert.

2.3. Absorption des Anti M 6-Serums

Als Beispiel für ein Serum mit partiell organspezifischen Antikörpern wurde das Serum eines Patienten mit Iproniazid induzierter Hepatitis (Anti M 6 positiv), das nur mit unbehandelten und Nagarse behandelten Leber- und Nieren SMP sowie mit der outer membrane Fraktion reagierte (Abb. 8A), mit Herz-, Leber- und Nieren SMP absorbiert.

Nur Absorption mit Leber- und Nieren SMP beseitigte die Anti M 6 Antikörper (Abb. 8B b,c), während Absorption mit Herz SMP keinen Einfluß auf die Anti M 6 Aktivität hatte (Abb. 8B a).

2.4. Absorption von Anti M 2 positiven Seren

2.4.1. Absorption von Serum Nr.1 (Abb.9)

Ein PBC Serum, das keine Reaktion mit Leber SMP zeigte, aber einen hohen Anti M 2 Titer hatte (Abb. 9A), wurde mit Herz-, Leber- und Nieren SMP absorbiert und anschließend im ELISA gegen das M 2 Antigen aus Rinderherz, den SMP-SN aus Lebermitochondrien sowie gegen Nagarse behandelte und unbehandelte Herz-, Leber- und Nieren SMP getestet.

Es zeigte sich, daß nach Absorption mit Herz SMP das Serum weder mit M 2 aus Rinderherz noch mit dem SMP-SN aus Rattenleber reagierte. Auch mit Herz- und Nieren-SMP erhielt man keine Reaktion mehr Abb. 9B a).

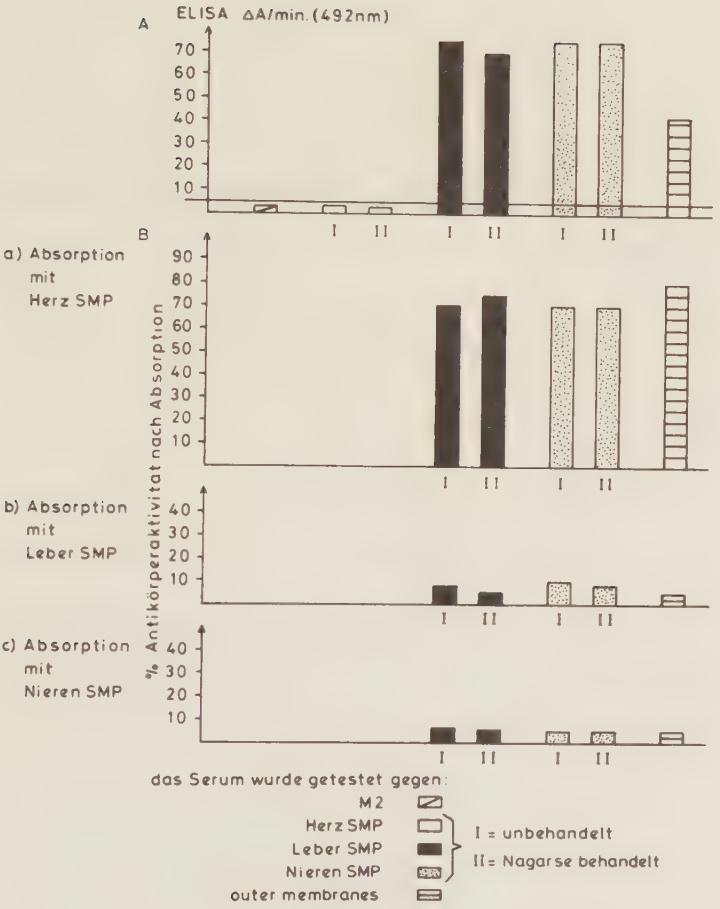

Abb. 8 A. Antikörperaktivitäten eines Anti M 6-Serums mit verschiedenen Antigenfraktionen
B. Absorption des Anti M 6-Serums mit Herz- (a), Leber- (b) und Nieren SMP (c)

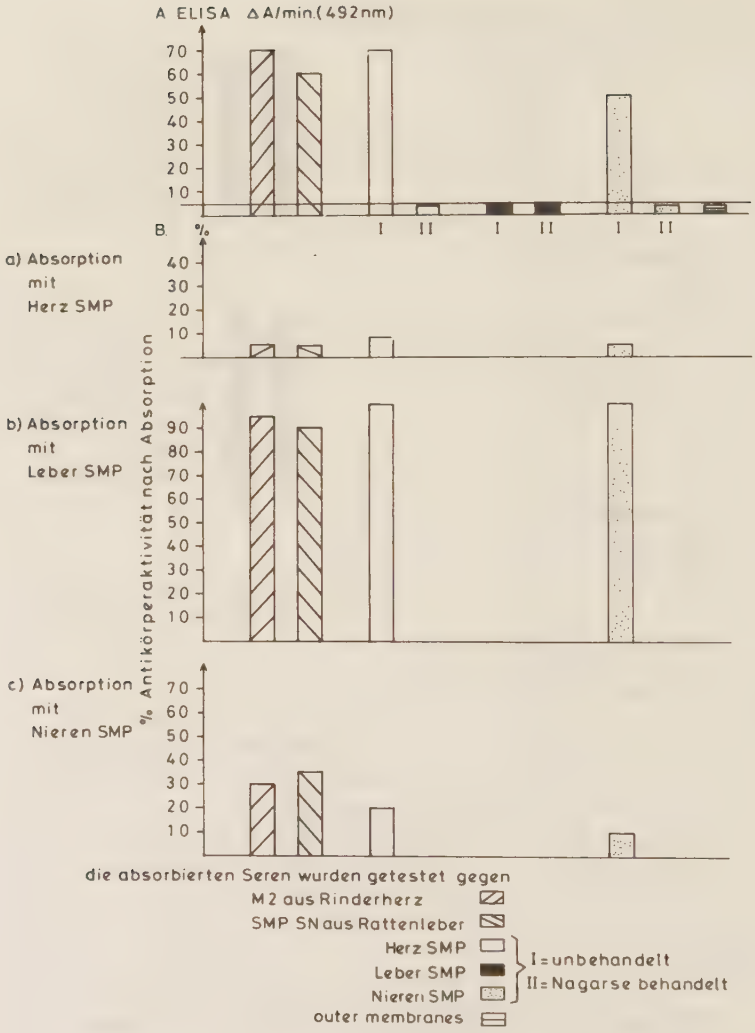

Abb. 9 A. Antikörperaktivitäten eines PBC Serums, das nur Anti M 2 Antikörper besitzt, mit verschiedenen Antigenfraktionen
B. Absorption des Serums mit Herz- (a), Leber- (b) und Nieren SMP (c)

Absorption mit Leber SMP dagegen verminderte nicht die Aktivität mit M 2, Herz- oder Nieren SMP oder dem Leber SMP-SN (Abb. 9B b), d.h. an Leber SMP befindet sich kein M 2 Antigen mehr, wie an Herz- oder Nieren SMP, sondern es wurde durch das Beschallen der Lebermitochondrien vollständig von der Membran gelöst und findet sich daher im Leber SMP-SN wieder.

Absorption mit Nieren SMP konnte die M 2 Aktivität nicht vollständig beseitigen (Abb. 9B c). Daraus kann man schließen, daß an Nieren SMP das M 2 Antigen nicht in der Konzentration gebunden ist wie an Herz SMP, so daß die Menge nicht ausreicht, um alle Anti M 2 Antikörper abzufangen.

2.4.2. Absorption von PBC Serum Nr. 2

2.4.2.1. Getestet im ELISA (Abb. 10)

Serum 2 reagiert mit M 2, Herz- und Nieren SMP, zusätzlich aber auch mit einer Nagarse insensitiven Antigendeterminante an Leber SMP (Abb. 10A).

Während die Anti M 2 Aktivität wieder durch Absorption mit Herz- oder Nieren SMP vermindert wurde (Abb. 10B a, c), nahm die Aktivität mit behandelten und unbehandelten Leber SMP nur durch Absorption mit Leber SMP, nicht durch Inkubation mit Herz- oder Nieren SMP ab (Abb. 10B b).

Das Serum reagierte auch mit einer Antigenfraktion, die äußere Mitochondrienmembranen enthielt. Auch diese Reaktion wurde durch Absorption mit Leber SMP vermindert, nicht, wie bei Anti M 3 Seren (s. 2.2.), durch Absorption mit Herz- und Nieren SMP.

Dieses Serum enthält also neben organunspezifischen An-

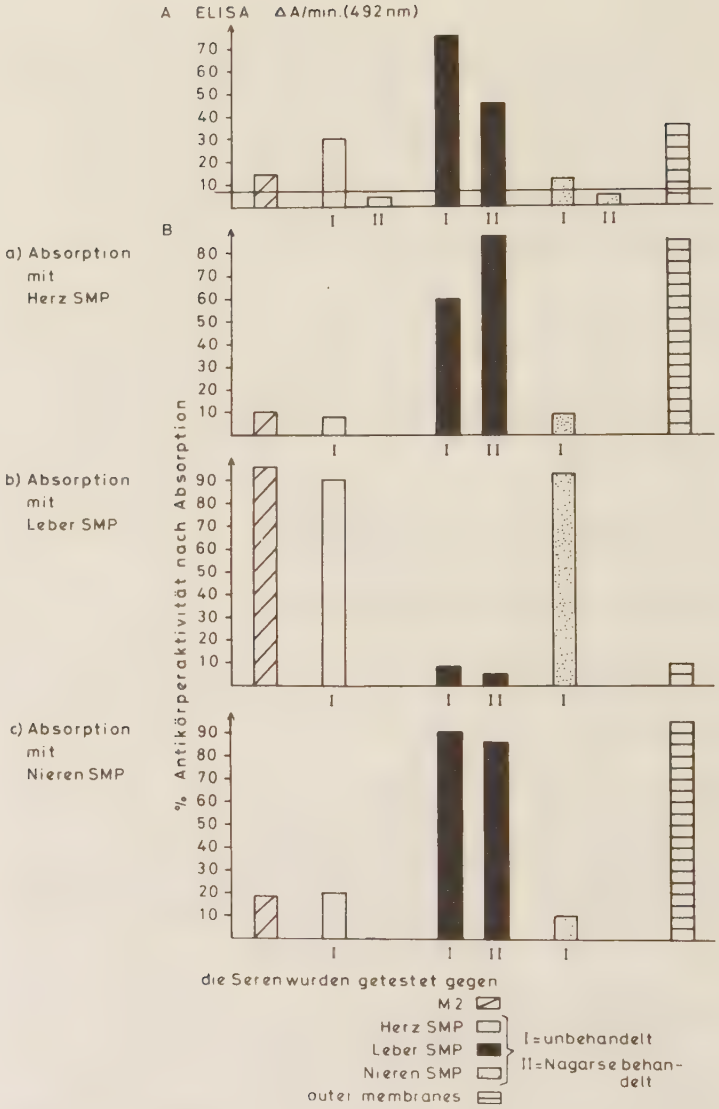

Abb. 10 Absorption eines PBC Serums, das schwach mit M 2 und zusätzlich mit einer Nagarse insensitiven Determinante an Leber SMP reagiert
A. Antikörpertiter mit verschiedenen Antigenen
B. Absorption mit Herz- (a), Leber- (b) und Nieren SMP (c)

ti M 2 Antikörpern einen organspezifischen Antikörper, der gegen ein Protease insensitives Antigen, wahrscheinlich an der äußeren Membran von Lebermitochondrien, gerichtet ist.

2.4.2.2. Darstellung der Absorption von Serum Nr. 2 in der Immundiffusion

Für die Immundiffusion mußten die Seren nach der zweiten Absorption verwendet werden, da nach der dritten Absorption die Serumverdünnung zu stark war.

Das PBC Serum Nr. 2 mit schwachem Anti M 2 Titer und organspezifischen Antikörpern gegen Leber SMP wurde auf präzipitierende Antikörper gegen beschallte Leber- und Nierenmitochondrien getestet.

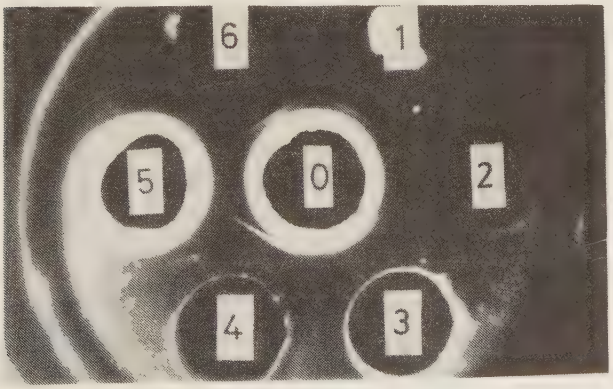

Abb. 11 Nachweis von leberspezifischen Antikörpern in der Immundiffusion; 0) enthält beschallte Lebermitochondrien, 1) Serum 2 Kontrolle (1:4 verdünnt), 2) Serum 2 nach Absorption mit Leber SMP, 3) Serum 2 nach Abs. mit Nieren SMP, 4) Serum 2 nach Abs. mit Herz SMP, 5) beschallte Nierenmitochondrien, 6) Serum 2 unverdünnt

Es reagierte nicht mit Nierenmitochondrien (Abb. 11), zeigte aber eine scharfe Bande mit Lebermitochondrien, die auch nach Absorption des Serums mit Herz- und Nieren SMP erhalten blieb, aber deutlich schwächer wurde nach Absorption des Serums mit Leber SMP.

2.4.3. Absorption von PBC Serum Nr. 3 (Abb. 12)

Absorption von Serum 3 mit Herz SMP entfernte zwar die Anti M 2 Antikörper, das Serum reagierte aber weiterhin mit der Fraktion äußerer Mitochondrienmembranen der Leber und einer Nagarse insensitiven Determinante an Leber- und Nieren SMP (Abb. 12B a). Die Antikörper gegen diese Fraktionen konnten nur durch Absorption mit Leber- oder Nieren SMP beseitigt werden, wobei Leber SMP nur diese Leber-Niere spezifischen Antikörper (Abb. 12B b), Nieren SMP auch die Anti M 2 Antikörper absorbierten (Abb. 12B c).

2.5. Absorption des Mischform-Serums (Abb. 13)

Das Serum enthielt gleichzeitig Anti M 2 und Anti M 4 Antikörper und reagierte daher sowohl mit M 2 als auch mit der outer membrane Fraktion und einer Nagarse insensitiven Determinante an Herz-, Leber- und Nieren-SMP (Abb. 13A).

Die Anti M 2 Antikörper wurden durch Herz- und Nieren SMP vollständig absorbiert. Die Anti M 4 Antikörper konnten durch Absorption mit Herz-, Leber- und Nieren SMP vollständig entfernt werden (Abb. 13B). Nach Absorption mit Herz- und Nieren SMP blieb jedoch eine hohe Restaktivität mit Nagarse behandelten und unbehandelten Leber SMP und auch mit der outer membrane Fraktion (Abb. 13B a,c).

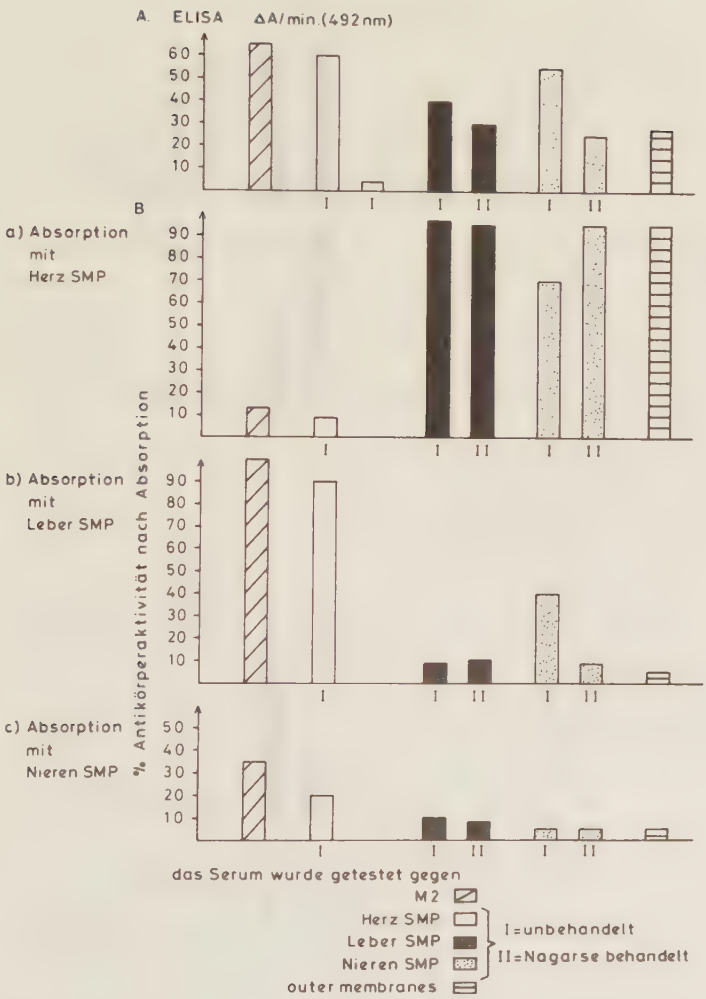

Abb. 12 Absorption eines PBC Serums, das mit M 2 und einer Nagarse insensitiven Determinante an Leber- und Nieren SMP reagiert
A. Antikörpertiter mit verschiedenen Antigenfraktionen
B. Absorption mit Herz- (a), Leber- (b) und Nieren SMP (c)

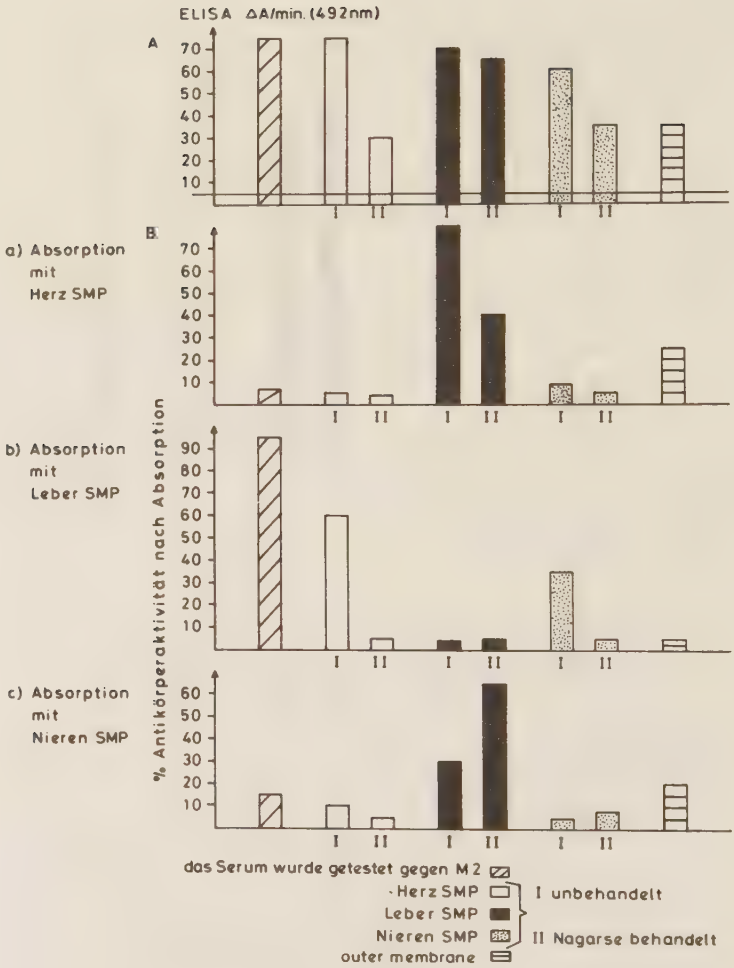

Abb. 13 Absorption eines Anti M 2 + Anti M 4 positiven Serums
A. Antikörperaktivitäten mit verschiedenen Antigenfraktionen
B. Absorption des Serums mit Herz- (a), Leber- (b) und Nieren SMP (c)

Das bedeutet, daß das Serum neben den organunspezifischen Anti M 2 und Anti M 4 Antikörpern noch den organspezifischen Antikörper gegen eine Nagarse insensitive Antigendeterminante an Leber SMP, wie er schon in PBC Serum Nr. 2 demonstriert wurde (s. 2.4.2.), enthalten muß.

2.6. Zusammenfassung

Während die organunspezifischen Antikörper Anti M 3 und Anti M 4 mit Herz-, Leber- und Nieren SMP und die partiell organspezifischen Anti M 6 Antikörper mit Leber- und Nieren SMP absorbiert werden konnten, gibt es in PBC Seren zusätzlich zu den Anti M 2 Antikörpern noch einen organspezifischen Antikörper, der sich nur an Leber SMP, nicht jedoch an Herz SMP bindet, aber mit Nieren SMP kreuzreagieren kann.

Da diese leberspezifischen Antikörper mit der outer membrane Fraktion aus Lebermitochondrien reagieren, unterscheiden sie sich klar von den organunspezifischen Anti M 2 Antikörpern. Wie gezeigt werden wird, können sie auch eindeutig von den anderen bisher bekannten Anti M 1 bis Anti M 8 Antikörpern differenziert werden und werden daher Anti M 9 genannt.

Auf ihre nähere Charakterisierung und ihre Bedeutung wird im Folgenden eingegangen werden.

3. Lokalisation und Charakterisierung von M 9

Für diese Studien verwendeten wir zwei Seren von Patienten mit PBC, die nur mit M 9, nicht mit M 2 reagierten.

3.1. Bestätigung der Organspezifität von M 9

3.1.1. Reaktion von Anti M 9 mit Mitochondrien aus verschiedenen Organen

Die Anti M 9 Seren wurden gegen SN 40 und Mitochondrien aus Rattenlunge, -skelettmuskel, Rinderpankreas und -leber, Schweinemilz und braunem Fettgewebe von Kaninchen sowie aus humaner Leber getestet.

Eine positive Reaktion erhielt man nur mit den Antigenfraktionen aus Rinderleber und humaner Leber. Anti M 9 Antikörper sind also organ- aber nicht speziesspezifisch.

3.1.2. Reaktion von Anti M 9 mit Mitochondrien aus Neurospora crassa

Die sieben absorbierten Seren wurden auch gegen beschallte Mitochondrien aus Neurospora crassa getestet. Alle Seren, auch das Normalserum, wiesen hohe Aktivitäten auf (Abb. 14).

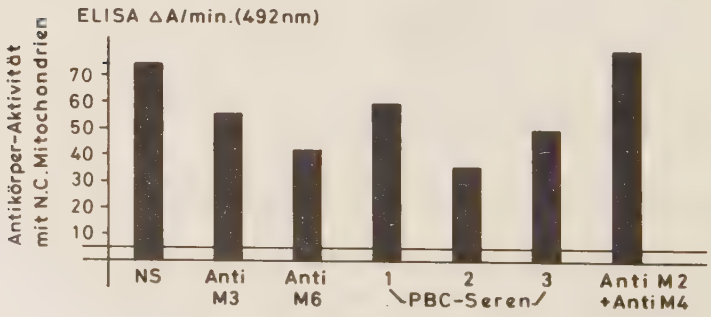

Abb. 14 Antikörperaktivitäten der sieben Marker-Seren mit Neurospora crassa Mitochondrien vor der Absorption

Die Reaktion des Normalserums oder der Seren mit Anti M 3 und Anti M 6 Antikörpern mit den Neurospora crassa Mitochondrien konnte weder durch Absorption mit Herz- noch durch Absorption mit Leber- oder Nieren SMP aufgehoben werden (Abb. 15). Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß sich an Neurospora crassa Mitochondrien kein M 3 oder M 6 Antigen befindet. Weiterhin müssen diese Mitochondrien ein zusätzliches Antigen besitzen, das weder an Herz- noch an Leber- oder Nierenmitochondrien zu finden ist, und mit dem auch Normalseren reagieren können.

Absorption der drei PBC Seren mit Herz SMP verminderte die Antikörperaktivität mit Neurospora crassa Mitochondrien in diesen Seren auf 35-70% der ursprünglichen Aktivität (Abb. 15), da die Anti M 2 Antikörper, die auch mit diesen Mitochondrien kreuzreagieren (105), absorbiert worden waren, so daß nur noch die Antikörper, mit denen auch Normalseren reagieren, vorhanden waren.

Dagegen nahm nach Absorption der Anti M 9 positiven PBC Seren und des Mischform Serums mit Leber SMP die Aktivität mit Neurospora crassa Mitochondrien nur unbedeutend ab.

Neurospora crassa Mitochondrien haben demnach das M 2 Antigen der inneren Membran gemeinsam mit Mitochondrien aus Herz, Leber und Niere, während ihnen aber das Antigen M 9 wie auch andere Antigene der äußeren Mitochondrienmembran (M 3, M 4, M 6) fehlen.

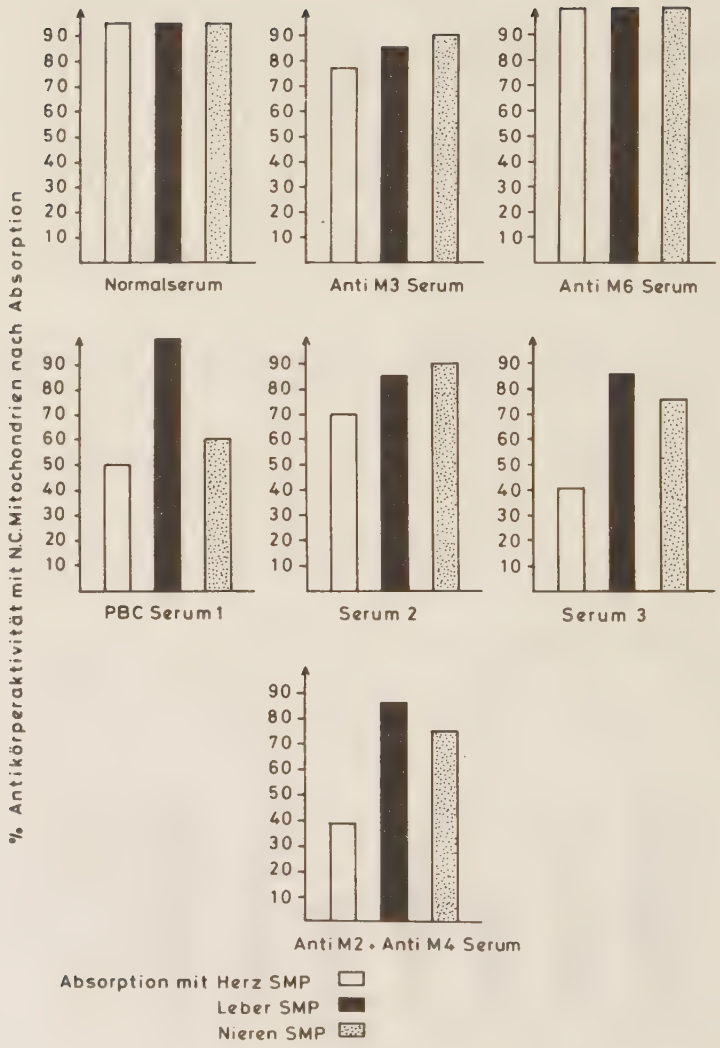

Abb. 15 Antikörperaktivitäten der sieben Seren mit Neurospora crassa Mitochondrien nach Absorption mit Herz-, Leber- und Nieren SMP

3.2. Lokalisation von M 9

Wir testeten die zwei Anti M 9 positiven Seren gegen innere und äußere Mitochondrienmembranen, Mikrosomen und Plasmamembranen sowie gegen SMP aus Rattenleber. Um diese Fraktionen auf ihre Reinheit zu überprüfen, wurden sie auf Markerenzyme und gegen Markerseren mit Anti M 2 (innere Membran), Anti M 3 (äußere Membran) und Anti LKM-Spezifität (Marker für Mikrosomen) getestet (Tabelle 4).

Dabei zeigte sich, daß die Anti M 9 Seren mit allen Fraktionen, die mit äußerer Mitochondrienmembran kontaminiert waren, reagierten. Da sie auch mit Fraktionen, die keine innere Mitochondrienmembran enthielten (Plasmamembranen, Mikrosomen), positive Reaktionen zeigten, aber nur schwach mit der gering mit äußerer Membran verunreinigten inner membrane-Fraktion reagierten, scheint das M 9 Antigen - wie auch schon die Absorptionsstudien ergaben (s.2.4.) - mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert zu sein.

3.3. Reaktion von M 9 auf Behandlung mit verschiedenen Enzymen im Vergleich zur Reaktion von M 2

Herz-, Leber- und Nieren SMP sowie das M 2 Antigen aus Rinderherz wurden mit Nagarse, Trypsin, DNAase, RNAase und Lipase behandelt und anschließend gegen Anti M 2 und Anti M 9 Seren getestet. Dabei zeigte sich, daß weder das M 2 noch das M 9 Antigen durch DNAase oder RNAase zerstört werden konnten.

Das M 2 Antigen an Herz SMP wurde schon durch geringe Nagarsekonzentrationen (25µg/mg Protein) zerstört (Abb. 16A a). Zugabe von geringen Mengen Trypsin dagegen steigerte in einem Anti M 2 Serum zunächst die Antikörperaktivität (Abb. 16A b), nach Zugabe größerer Mengen

Tabelle 4 Lokalisierung des M 9 Antigens mit Hilfe von 2 Anti M 9 Seren, die im ELISA gegen verschiedene subzelluläre Antigenfraktionen aus Rattenleber ausgetestet wurden

Antigenfraktionen aus Rattenleber	Reaktion der Enzymmarker x)				serologische Charakterisierung der subzellulären Fraktionen mit Hilfe von Marker Seren für			Anti M 9 Aktivität
	1	2	3	4	innere Mitochondrienmembran (Anti M 2)	äußere Mitochondrienmembran (Anti M 3)	Mikrosomen (Anti LKM)	
Plasmamembranen	+	+	+	Ø	Ø	+	+	+
Mikrosomen	Ø	+	+	Ø	Ø	+	+	+
outer membranes	Ø	+	+	(+)	Ø	+	+	+
SMP	Ø	+	+	+	Ø	+	+	+
inner membranes	Ø	Ø	(+)	+	+	(+)	Ø	(+)

x)
1 Enzymmarker für Plasmamembranen: 5'- Nucleotidase
2 Enzymmarker für Mikrosomen: Glucose-6-Phosphatase
3 Enzymmarker für äußere Mitochondrienmembranen: Rotenon-insensitive NADH-Cytochrom C Reduktase
4 Enzymmarker für innere Mitochondrienmembranen: Succinat-Cytochrom C Reduktase

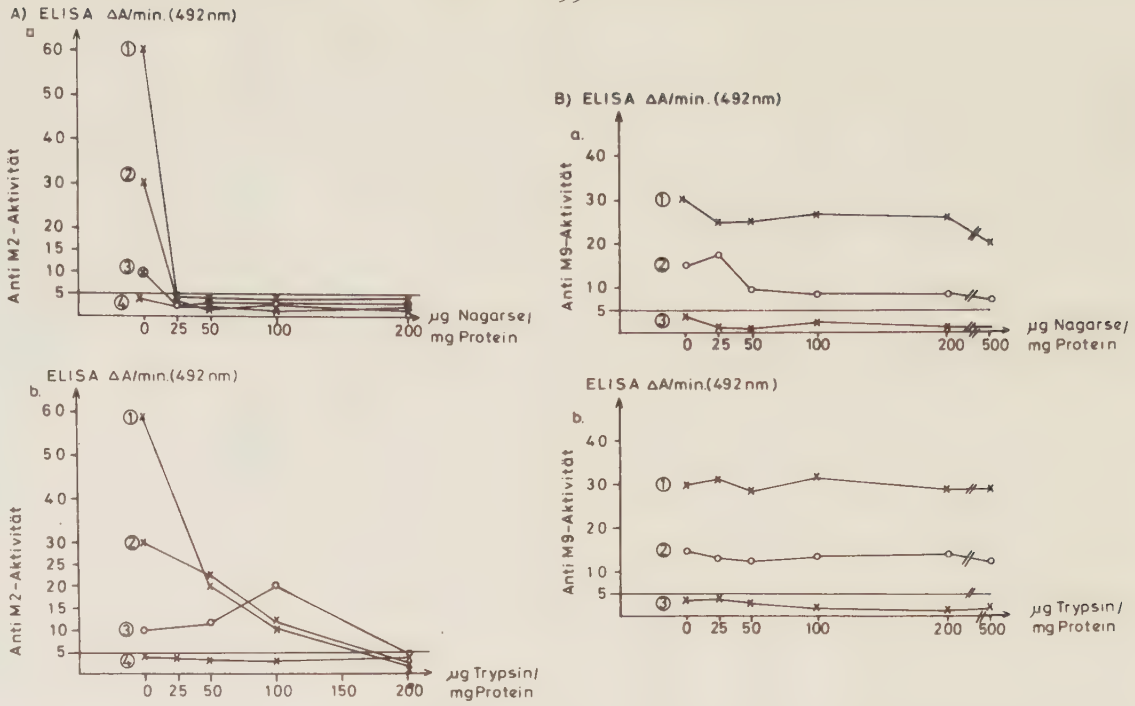

Abb. 16 A) Anti M 2 Aktivität mit Herz SMP nach Behandlung der SMP mit Nagarse (a) und Trypsin (b) in unterschiedlichen Konzentrationen, getestet in 3 Anti M 2 positiven PBC Seren (1-3) und in einem Normalserum (4)
B) Anti M 9 Aktivität nach Behandlung von Leber SMP mit Nagarse (a) und Trypsin (b) in unterschiedlichen Konzentrationen, getestet in 2 Anti M 9 positiven PBC Seren (1,2) und in einem Anti M 9 negativen Serum (3)

Trypsin (200µg/mg Protein) war das Antigen vollständig zerstört.

Dasselbe Ergebnis erhielt man, wenn man die reine M 2 Fraktion aus Rinderherz mit Trypsin behandelte: bei Serum 3 stieg bei Behandlung des Antigens mit 50 bzw. 100µg/ml Protein die Antikörperaktivität zunächst an, bei Behandlung mit 200µg Trypsin/mg Protein war das Antigen zerstört (nicht dargestellt).

M 9 dagegen verlor nie vollständig seine Antigenität, selbst nicht nach Behandlung mit hohen Konzentrationen Trypsin oder Nagarse (Abb. 16B a,b).

Inkubation mit Lipase verminderte die M 9 Antigenität, veränderte aber nicht die Aktivität von M 2.

3.4. Dichte von M 9

Legt man die SN 40 aus Rinderherz, Rattenleber und Schweineniere auf Sucrose-Dichtegradienten, so findet man die Hauptaktivität für Anti M 9 Antikörper in den Gradienten 1.10-1.12 mit Rattenleber. Es gibt aber auch Anti M 9 positive/Anti M 2 negative Seren, die die größte Aktivität mit den Dichtegradienten 1.19-1.28 zeigen.

Die Anti M 9 Antikörper reagierten mit keinem der Dichtegradienten aus Herz oder Niere.

Im Gegensatz dazu fand sich das M 2 Antigen, und zwar für alle drei Organe gleich, nur in den Gradientenstufen 1.19-1.28.

4. Unterscheidung von Anti M 9 von anderen antimitochondrialen Antikörpern im ELISA mit Hilfe verschiedener Antigenfraktionen

4.1. Unterscheidung Anti M 9 - Anti ANT Antikörper

Kürzlich wurden von Schultheiß et al. organspezifische Antikörper gegen den Adeninnukleotid Translokator (ANT) aus Lebermitochondrien in Seren von Patienten mit PBC nachgewiesen (97).

Wie aber aus Tabelle 5 ersichtlich ist, sind diese Anti ANT-Antikörper nicht identisch mit den Anti M 9 Antikörpern. Während der ANT an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und Protease-sensitiv ist, gehört M 9 eher der äußeren Mitochondrienmembran an und wird durch Proteasebehandlung nicht zerstört. Der ANT findet sich im Sucrose-Dichtegradienten 1.04 (Sucrosekonzentration 12-14%), M 9 in den Gradientenstufen 1.10-1.12 (24-29%).

Tabelle 5 Kriterien zur Differenzierung von M 9 und ANT

Kriterien	Antigene	
	M 9	ANT
a) Lokalisation		
outer membrane	+	Ø
inner membrane	Ø	+
b) Behandlung der Antigene mit Proteasen		
Protease-sensitiv	Ø	+
Protease-insensitiv	+	Ø
c) Sucrose-Dichtegradienten	1.04	1.10-1.12
Konzentration	12-14%	24-29%

4.2. Differenzierung von Anti M 9 von Anti M 1-Anti M 8 Spezifitäten

4.2.1. Säulenchromatographische Auftrennung von SMP-SN aus verschiedenen Organen

SMP-SN aus Rinderherz, Schweineniere, Ratten-, Rinder- und humaner Leber wurden auf eine Sepharose 6B Säule aufgetragen und mit TSE-Puffer eluiert. Man erhielt drei Peak unterschiedlicher Höhe. Die einzelnen Fraktionen wurden gepoolt und im ELISA mit Markerseren mit Anti M 1-Anti M 9 Spezifität und mit einem Anti LKM Serum auf ihren Antigengehalt ausgetestet.

Säulenchromatographische Auftrennung des SMP-SN aus Rattenleber führte zu einer eindeutigen Dissoziation von M 2 und den Antigenen der äußeren Mitochondrienmembran. Während Peak 1 nur M 3, M 4, M 6, M 8, M 9 und das LKM-Antigen enthielt, stellte der zweite Peak eine reine M 2 Fraktion dar, die nur schwach mit M 6 und M 9 kontaminiert war(Abb. 17).

Mit Hilfe dieser Methode gelingt es sehr leicht, eine Fraktion mit äußeren Mitochondrienmembranen zu isolieren, die nicht mehr mit M 2 kontaminiert ist.

Nach Auftrennen von Rinderherz-, Schweineniere- und Rinderleber SMP-SN über Sepharose 6B enthielt auch Peak 1, das Ausschlußvolumen, M 2 in hoher Konzentration (Abb. 18, 19, 20).

Diese Beobachtung deutet darauf hin, daß hier M 2 noch an Membranfragmente gebunden ist, während es im Rattenleber SMP-SN durch das Beschallen vollständig von der Membran getrennt wurde und in löslicher Form vorlag.

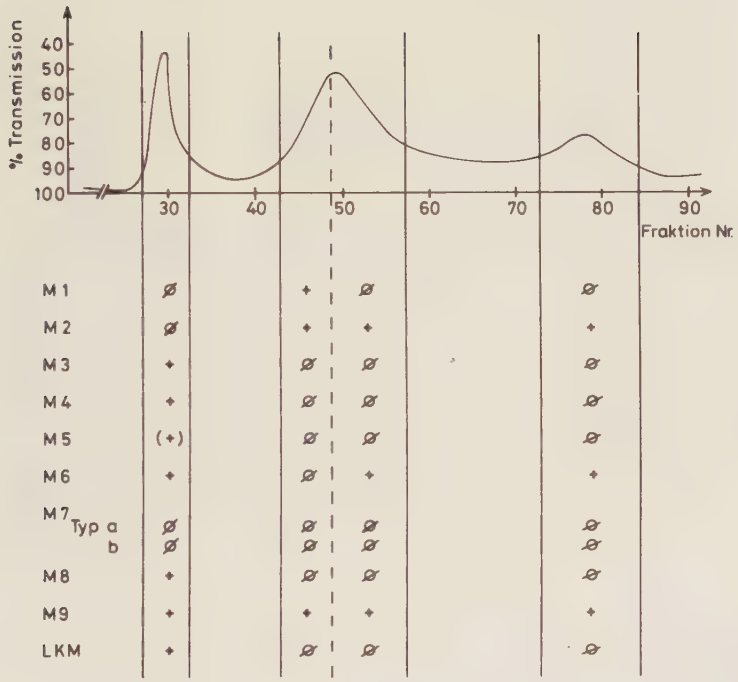

Abb. 17 Reaktion der Markerseren Anti M 1-Anti M 9 und des Anti LKM Serums mit Fraktionen, die durch säulenchromatographische Auftrennung (Sepharose 6B) des SMP-SN aus Rattenleber gewonnen wurden.
Peak 1 enthält nur Antigene der äußeren Mitochondrienmembran, Peak 2 und 3 enthalten vorwiegend M 2 und sind nur schwach mit M 6 und M 9 kontaminiert.

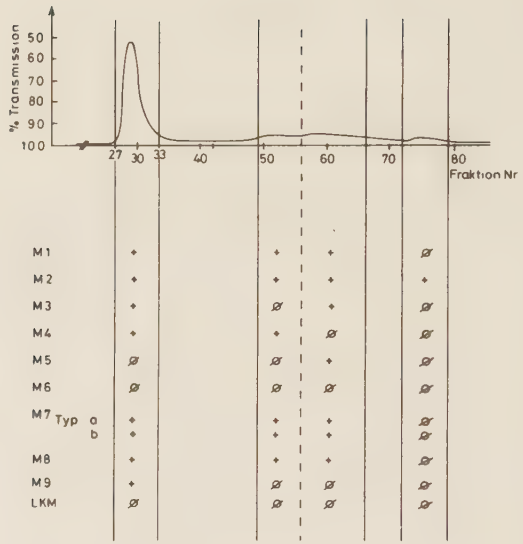

Abb.18 Reaktion der Markersera mit den Fraktionen, die durch säulenchromatographische Auftrennung von SMP-SN aus Rinderherz gewonnen wurden. Peak 3 stellt eine reine M 2 Fraktion dar, während Peak 1 alle Antigene außer M 5 und den Leber/Niere spezifische Antigenen M 6 und LKM bzw. dem leberspezifischen Antigen M 9 enthält

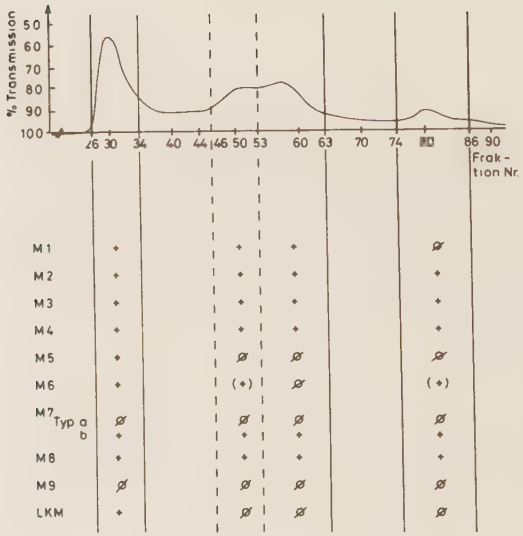

Abb.19 Reaktion der Markersera mit den Fraktionen nach Auftrennung des SMP-SN aus Schweineniere. Eine Differenzierung zwischen den Antigenen ist nicht möglich

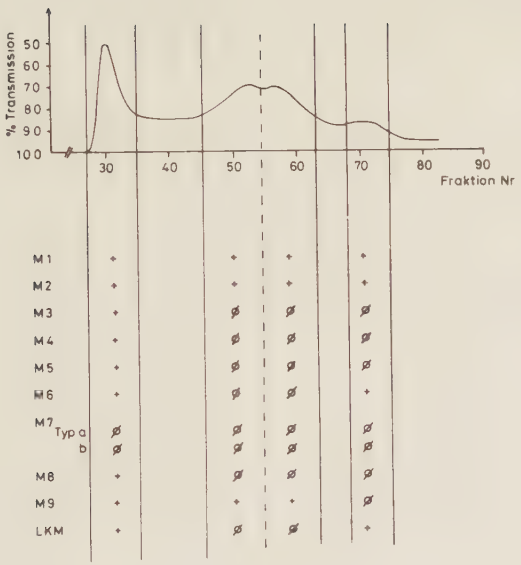

Abb.20 Reaktion der Markerseren Anti M 1-Anti M 9 und des Anti LKM Serums mit Fraktionen, die durch säulenchromatografische Auftrennung des SMP-SN aus Rinderleber gewonnen wurden. M 7 (Herz- bzw. Herz/Niere spezifisch) findet sich in keiner Fraktion. Peak 1 enthält alle Antigene außer M 7, Peak 2 enthält vorwiegend M 2 und ist nur schwach mit M 1 und M 9 kontaminiert

Der SMP-SN aus humaner Leber enthielt M 2 nur in einer sehr geringen Konzentration. Seine säulenchromatographische Auftrennung ermöglichte eine Dissoziation von M 3 und M 4, da M 3 nur im ersten Peak, M 4 auch in Peak 3 vorkam. Peak 3 enthielt auch M 1, M 5, M 9 und in einer sehr geringen Konzentration M 2. M 7 trat in keiner der Fraktionen auf (Abb. 21).

Das M 9 Antigen wurde in allen SMP-SN aus Leber (Ratten-, Rinder- und humane Leber) gefunden. Die höchste Aktivität wies es jeweils im ersten Peak auf.

M 2 fand sich in den SMP-SN aus allen Organen außer aus humaner Leber. Nur im SMP-SN aus Rattenleber konnte es

von den Antigenen der äußeren Membran dissoziiert werden und fand sich in fast reiner Form in Peak 2 und 3.

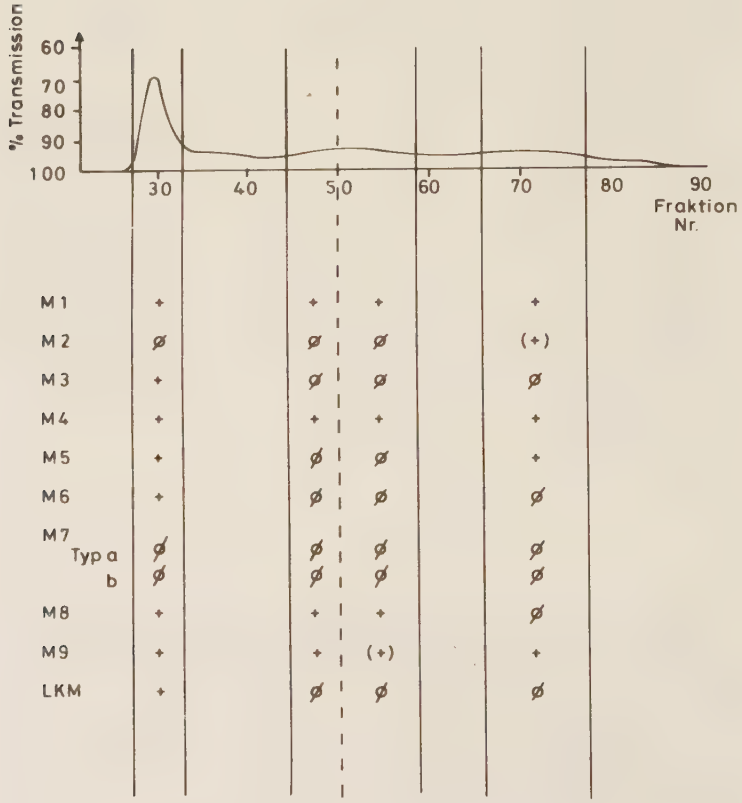

Abb. 21 Reaktion der Markerseren Anti M 1-Anti M 9 und des Anti LKM Serums mit Fraktionen, die durch säulenchromatographische Auftrennung des SMP-SN aus humaner Leber gewonnen wurden.
M 2 findet sich in nur sehr geringer Konzentration in Peak 3. M 3 und M 4 können dissoziiert werden, da M 4 auch in Peak 3 vorkommt, M 3 aber nur in Peak 1. M 7 tritt in keiner Fraktion auf.

4.2.2. Differenzierung von Anti M 1-Anti M 9 mit Hilfe von SMP aus verschiedenen Organen und spezifischen Antigenfraktionen

Wie Tabelle 6 zeigt, können Anti M 9 Antikörper im ELISA leicht von den AMA Spezifitäten Anti M 1-Anti M 8 unterschieden werden, da sie nur mit Leber SMP und einer outer membrane Fraktion aus Lebermitochondrien reagieren. Eine ähnliche Reaktion zeigen nur noch die Anti M 6 Antikörper, die aber zusätzlich mit SMP und outer membranes aus Niere reagieren. Auch mit Hilfe von Dichtegradienten können Anti M 6 und Anti M 9 Antikörper deutlich unterschieden werden, da Anti M 6 Antikörper mit den Gradientenstufen 1.16-1.28 aus SN 40 von Niere und Leber, Anti M 9 Antikörper (sowohl organspezifische als auch solche, die eine Kreuzreaktion mit Nieren SMP zeigen), vorwiegend mit den Gradientenstufen 1.10-1.12 aus SN 40 von Leber (bzw. Niere) reagieren.

Außer Anti M 7 Antikörpern, die ebenfalls organspezifisch sind, sich aber an SMP aus Herz bzw. Niere binden, sind alle anderen AMA gegen organunspezifische Antigendeterminanten der inneren (M 1: Cardiolipin; M 2: ATPase assoziiertes Antigen; M 5: noch nicht näher definiert) oder der äußeren Membran gerichtet (M 3, M 4, M 8).

M 8 kann leicht von M 3 und M 4 unterschieden werden, da es Nagarse sensitiv ist.

Eine Differenzierung von Anti M 3 und Anti M 4 Antikörpern konnte serologisch bisher nur insofern getroffen werden, als Anti M 4 Antikörper nur in Assoziation mit Anti M 2 Antikörpern auftreten,

Wie schon unter 4.2.1. dargestellt, zeigen Anti M 2 Seren nur eine sehr schwache Reaktion mit dem SMP-SN aus

Tabelle 6 Differenzierung der Antikörperspezifitäten Anti M 1-Anti M 9 im ELISA mit Hilfe verschiedener Antigenfraktionen

AMA Spezifität	Diagnose	Reaktion mit SMP aus Herz	Leber	Niere	Lokalisation inner membranes	outer membranes	Zerstörung durch Proteasen	Dichtegradienten	Bemerkungen
Anti M 1	SyphilisII	+	+	+	+	Ø	Ø	1.04-1.12	Cardiolipinantikörper
Anti M 2	PBC	+	Ø[x)]	+	+	Ø	+	1.19-1.18	ATPase ass. Antigen
Anti M 3	PLE	+	+	+	Ø	+	Ø	1.04-1.14	Ak nur vom IgG Typ
Anti M 4	Mischform PBC/CAH	+	+	+	Ø	+	Ø	1.04-1.12	nur in Ass. mit Anti M2
Anti M 5	ANA neg. Kollagenose	+	+	+	+	Ø	Ø	1.08-1.14	
Anti M 6	Iproniazid induzierte Hepatitis	Ø	+	+	Ø	+	Ø	1.16-1.28	Leber/Niere spezifisch
Anti M 7 Typ a	Cardiomyopathien; Myokarditiden	+	Ø	Ø	+	Ø	+	1.04-1.12	Herz-spezifisch
Typ b		+	Ø	+	+	Ø	+	1.04-1.12	Herz/Niere spezifisch
Anti M 8	progressiv verlaufende PBC	+	+	+	Ø	+	+	1.04-1.10	nur in Ass. mit Anti M2
Anti M 9	PBC Patienten(+Angehörige)	Ø	+	(+)	Ø	+	Ø	1.08-1.10	Leber-spezifisch

x) Anti M 2 Antikörper reagieren nur mit dem SMP-SN aus Ratten- oder Rinderleber. Sie zeigen keine Reaktion mit SMP oder dem SMP-SN aus humaner Leber

humaner Leber. Sie reagieren auch nicht mit den SMP aus humaner Leber.

5. Klinische Bedeutung der Anti M 9 Antikörper

5.1. Klinische Relevanz von Anti M 9 bei PBC Patienten

5.1.1. Häufigkeit von Anti M 9 bei 171 Patienten mit PBC

171 Patienten mit histologisch definierter primär-biliärer Zirrhose (DRK-Krankenhaus Hamburg: n=94, Heinz-Kalk-Klinik Bad Kissingen: n=77) wurden im ELISA auf Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper gegen das ATPase assoziierte Antigen M 2 und gegen Leber SMP getestet.

Wie Tabelle 7 zeigt, waren 91% der 171 Patienten Anti M 2 positiv, 39% hatten Anti M 9 Antikörper. Während Anti M 2 Antikörper in Früh- und Spätstadien gleich häufig vorkamen (in 90% bzw. 93%), hatten von den 96 Patienten mit Frühform der PBC 48%, von den 75 Patienten im Spätstadium nur 28% Anti M 9 Antikörper.

Tabelle 7 Häufigkeit von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern in Seren von 171 Patienten mit PBC in Relation zu den histologischen Stadien

AMA Typ	histologisches Stadium		insgesamt
	I/II	III/IV	
	n = 96	n = 75	n = 171
	Prozent (Anzahl) positiv		
Anti M 2	90 (86)	93 (70)	91 (156)
Anti M 9	48 (46)	28 (21)	39 (67)

Die Häufigkeit der Assoziation der beiden Antikörpertypen ist in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 Assoziation von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern in 171 PBC Seren in Relation zu den histologischen Stadien

AMA Spezifität		histologisches Stadium		insgesamt
Anti M 2	Anti M 9	I/II	III/IV	
		n = 96	n = 75	n = 171
		Prozent (Anzahl)		positiv
+	-	50 (48)	67 (50)	57 (98)
-	+	8 (8)	1 (1)	5 (9)
+	+	40 (38)	27 (20)	34 (58)
-	-	2 (2)	5 (4)	4 (6)

Dabei ergab sich, daß Anti M 2 und Anti M 9 in 40% der 96 Patienten mit PBC I/II gemeinsam vorkommen, aber nur in 27% der 75 Patienten mit PBC III/IV. Dagegen nimmt die Häufigkeit von isoliert auftretenden Anti M 2 Antikörpern von 50% im Frühstadium auf 67% im Spätstadium zu.

Anti M 9 Antikörper kamen bei der Frühform der PBC in 8% der Fälle isoliert vor, im Spätstadium nur in 1%.

4% der 171 Patienten hatten weder Anti M 2 noch Anti M 9 Antikörper, d.h. sie waren vollständig AMA negativ.

5.1.2. Immunglobulinklassen von Anti M 9 Antikörpern

Anti M 9 Antikörper sind nur vom IgG und IgM Typ. Im Gegensatz zu den Anti M 2 Antikörpern (14) werden sie nicht in der IgA Klasse gefunden.

Aus Tabelle 9a geht hervor, daß in über der Hälfte der Fälle (58% von 156 Anti M 2 positiven Patienten) Anti M 2 Antikörper gleichzeitig vom IgG und IgM Typ waren. Die Häufigkeit der Anti M 2 Antikörper, die nur vom IgG Typ waren, nahm leicht zu von 34% in Frühstadien auf 41% in Spätstadien. Nur in 4% der Fälle waren sie isoliert vom IgM Typ.

Tabelle 9a Immunglobulinklassen von Anti M 2 Antikörpern in 156 Anti M 2 positiven Patienten mit PBC in Relation zu den histologischen Stadien

Immunglobulinklassen von Anti M 2		histologisches Stadium		insgesamt
		I/II	III/IV	
IgG	IgM	n = 86	n = 70	n = 156
		Prozent (Anzahl) positiv		
+	-	34 (29)	41 (29)	37 (58)
-	+	6 (5)	3 (2)	4 (7)
+	+	60 (52)	56 (39)	58 (91)

Im Gegensatz dazu gehörten in 37% der 67 Anti M 9 positiven Patienten die Anti M 9 Antikörper nur zur IgM Klasse, wobei die Häufigkeit von 50% bei Fällen mit PBC I/II auf 10% bei PBC III/IV abnahm (Tabelle 9b). Anti M 9 Antikörper nur vom IgG Typ kamen im Frühstadium nur in 22% der 46 Patienten vor, dagegen in 62% der 21 Patienten im Spätstadium.

Tabelle 9b Immunglobulinklassen von Anti M 9 Antikörpern in 67 Anti M 9 positiven Patienten mit PBC in Relation zu den histologischen Stadien

Immunglobulinklassen von Anti M 9		histologisches Stadium		insgesamt
		I/II	III/IV	
IgG	IgM	n = 46	n = 21	n = 67
		Prozent (Anzahl)		positiv
+	-	22 (10)	62 (13)	34 (23)
-	+	50 (23)	10 (2)	37 (25)
+	+	28 (13)	29 (6)	28 (19)

Um zu zeigen, daß das gehäufte Auftreten von IgM-Anti M 9 Antikörpern nicht unspezifisch durch Interferenz mit Rheumafaktoren oder hohen IgM-Immunglobulinspiegeln entsteht, wurden Seren von 20 Patienten mit rheumatoider Arthritis, die im FIAX-Test-Kit hohe Rheumafaktortiter aufwiesen, und von 10 Patienten mit Plasmozytom mit stark erhöhten IgM Spiegeln auf Anti M 9 Antikörper getestet. Keiner der Patienten mit Plasmozytom und 4 der Patienten mit rheumatoider Arthritis (20%) hatten Anti M 9 Antikörper, davon 2 nur niedertitrig.

5.2. Häufigkeit und Bedeutung von Anti M 9 Antikörpern bei Patienten mit anderen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen

Anti M 9 Antikörper traten bei 37% der 156 Anti M 2 positiven und bei 60% der Anti M 2 negativen Patienten mit histologisch gesicherter PBC auf.

Während aber Anti M 2 Antikörper nur bei Patienten mit PBC gefunden wurden und damit einen wichtigen Marker für die serologische Diagnose darstellen, konnte man M 9 Antikörper auch bei Patienten mit anderen Er-

Tabelle 10 Häufigkeit von Anti M 9 Antikörpern bei hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen

Diagnose	Anzahl getestet	Prozent positiv
A) Lebererkrankungen		
- primär-biliäre Zirrhose (PBC)		
a) Anti M 2 positiv	156	37
b) Anti M 2 negativ	15	60
- autoimmune CAH		
a) ANA, SMA positiv	10	10
b) LP-Antikörper positiv	37	16
- akute und chronische virale Hepatitis	72	20
- alkoholische Lebererkrankung	25	10
- Morbus Wilson	5	0
- Haemochromatose	3	0
B) Herzerkrankungen		
- dilative und hypertrophische Kardiomyopathie	159	8
- akute Myokarditis	42	5
- angeborene Herzfehler	20	5
- Herzinfarkt	40	10
C) Kollagenerkrankungen		
- systemischer Lupus erythematosus (ANA/DNA positiv)	50	16
- progressive systemische Sklerodermie	34	3
- seropositive rheumatoide Arthritis	20	20
- Sjögren Syndrom (Anti Ro/Anti La positiv)	7	0
D) Organspezifische und -unspezifische Autoimmunerkrankungen		
- Thyreoiditis und Myxödem	20	20
- Morbus Addison	12	17
- juveniler Diabetes mellitus (Inselzellantikörper positiv)	12	17
- Myasthenia gravis	30	10
- autoimmune hämolytische Anämie	25	4

Fortsetzung Tabelle 10

E) Weitere Erkrankungen		
- Innenohrschwerhörigkeit	40	5
- Lymphome	20	0
- Plasmozytom	10	0
- Morbus Crohn, Colitis ulcerosa	20	5
- andere	80	6
F) Blutspender	100	15

krankungen nachweisen in bis zu 20% und bei 15% der gesunden Personen. Insgesamt hatten 16% der 887 Patienten mit unterschiedlichen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen (außer PBC) Anti M 9 Antikörper (Tabelle 10).

Ein Kollektiv von 45 Anti M 9 positiven Patienten mit verschiedenen unklaren Lebererkrankungen wurden auf Erhöhung von Immunglobulinspiegel, alkalische Phosphatase, Transaminasen und Bilirubin untersucht (Tabelle 11). Es zeigte sich, daß in den meisten Fällen die biochemischen Ergebnisse auf eine PBC hinweisen könnten. Von 26 der 45 Patienten lagen auch Leberbiopsien vor: in keinem der 26 Fälle konnte eine PBC mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die Anti M 9 Antikörper in diesen 45 Patientenseren waren in 22% nur vom IgG und in 62% nur vom IgM Typ (Tabelle 12). Diese Verteilung der Immunglobulinklassen entspricht der, wie sie für das Frühstadium der PBC gefunden wurde (Tabelle 9b).

Tabelle 11 Pathologische Befunde bei 45 Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen, die nur Anti M 9, keine Anti M 2 Antikörper hatten x)

Biochemische Parameter	pathologische Befunde Prozent (Anzahl) positiv
AP	90 (41)
GOT	80 (36)
GPT	89 (40)
Bilirubin	39 (18)
Immunglobuline IgG	27 (12)
IgM	80 (36)
IgA	35 (16)

x) Relation Frauen:Männer = 1:1

Von 26 Patienten lagen die Ergebnisse der Leberbiopsie vor: In allen Fällen konnte eine PBC nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden

Tabelle 12 Immunglobulinklassen der Anti M 9 Antikörper bei 45 Anti M 2 negativen Patienten mit verschiedenen unklaren Lebererkrankungen

Immunglobulinklassen von Anti M 9		Prozent (Anzahl) positiv
IgG	IgM	
+	-	22 (10)
-	+	62 (28)
+	+	16 (7)

6. Darstellung von Krankheitsverläufen bei PBC Patienten im Hinblick auf die Konstellation von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern

6.1. Patientin S.R. (Abb. 22)

Bei der Patientin S.R. (Jg. 1937) (Abb. 22) besteht seit 1975 histologisch der Verdacht auf eine PBC im Frühstadium. Seit damals sind Juckreiz und Oberbauchbeschwerden bekannt.

Wie die Cholestase-anzeigenden Enzyme zeigen, verläuft die Krankheit bei der Patientin unterschiedlich aktiv. Unter Imurek (1977-1979) war eine Beruhigung erkennbar; nach Absetzen stieg die AP wieder an.

Wie die Histologien ergeben haben, zeigt die Erkrankung insgesamt nur eine geringe Progression.

Das Serum war immer AMA negativ gewesen, im Immunfluoreszenztest konnten immer nur SMA nachgewiesen werden. Auch im ELISA reagierten die Seren nicht mit dem PBC spezifischen M 2 Antigen, es wurden aber eindeutig Anti M 9 Antikörper vom IgM Typ gefunden.

6.2. Patientin F.E. (Abb. 23)

Auch in Abb. 23 ist der Verlauf einer Patientin (Jg. 1917) mit PBC im Frühstadium dargestellt. Seit 1969 besteht klinisch starker Verdacht auf PBC. Eine Leberbiopsie von 1971 ergab histologisch einen Zustand nach abgelaufener Hepatitis mit geringgradiger Fibrose und Verfettung der Leber. Die AP war stark erhöht, die Transaminasen stiegen ab 1981 stark an.

Die Patientin hatte im gesamten Verlauf keine Anti M 2 Antikörper, Anti M 9 vom IgM Typ waren aber immer nachweisbar. Außerdem hatte die Patientin in allen Seren

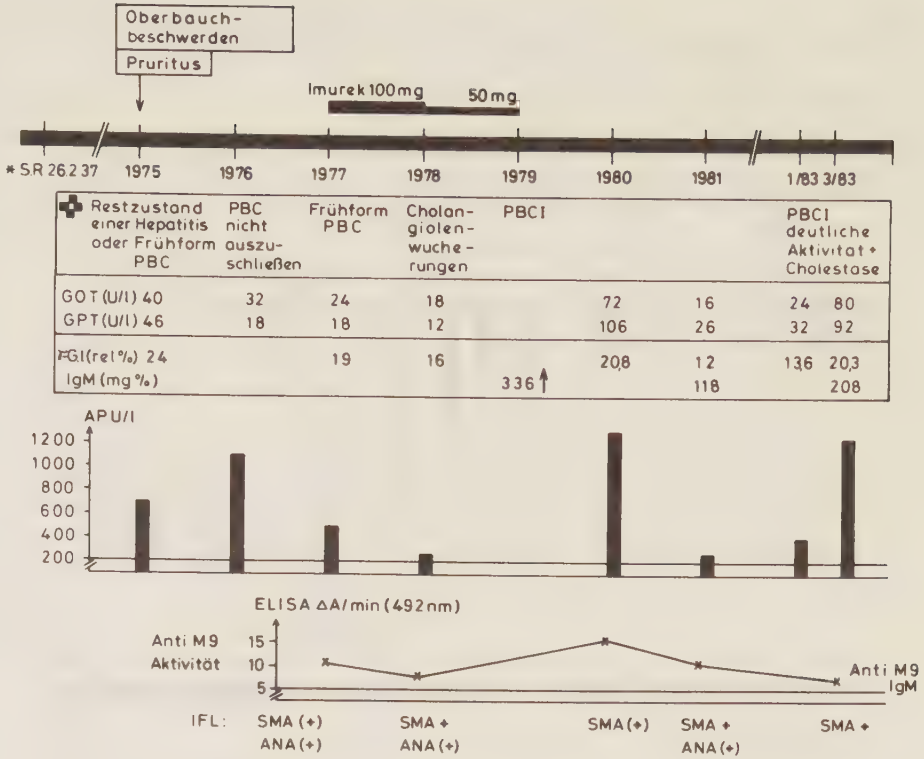

Abb. 22 Gutartiger Verlauf einer seit 8 Jahren im Stadium I persistierenden PBC bei einer Patientin, in deren Seren nur Anti M 9 Antikörper nachweisbar waren

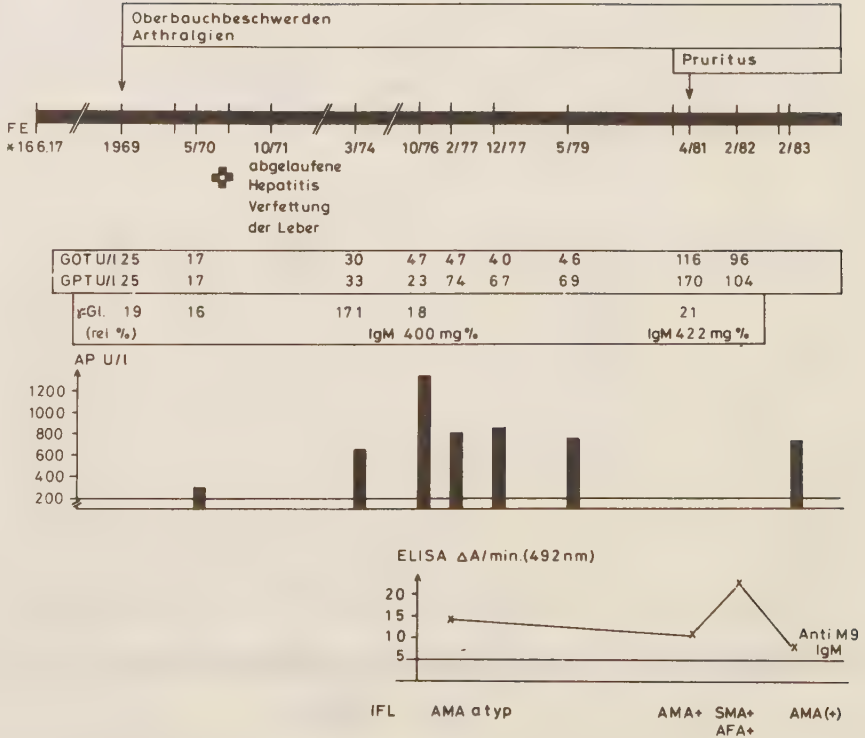

Abb. 23 Gutartiger Verlauf einer PBC über 14 Jahre bei einer Patientin, in deren Seren nur Anti M 9 Antikörper nachweisbar waren

komplementbindende Antikörper gegen SN 40 und die outer membrane Fraktion aus Leber.

6.3. Patientin B.T. (Abb. 24)

Die Patientin B.T. (Abb. 24) (Jg. 1912) klagt seit 1980 über Oberbauchbeschwerden. 1982 wurde in einer Leberbiopsie eine gering aktive CAH diagnostiziert. Im Serum zu dieser Zeit waren nur Anti M 9 Antikörper nachweisbar. Innerhalb eines halben Jahres kamen jedoch auch Anti M 2 Antikörper vom IgM Typ hinzu, der Anti M 9 Titer nahm ab. Damit liegt serologisch eindeutig eine PBC vor. Auch die isolierte Erhöhung der IgM Globuline und die erhöhte AP weisen auf eine PBC hin.

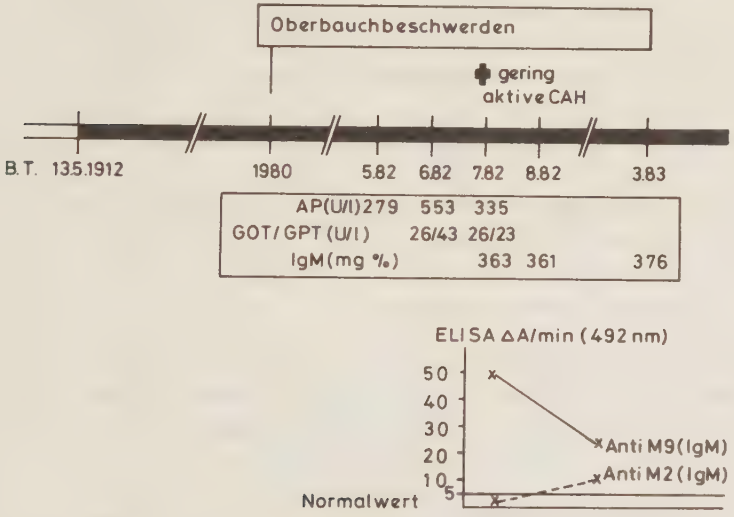

Abb. 24 Krankheitsverlauf einer Patientin bei der klinisch der Verdacht auf PBC besteht und bei der zunächst nur Anti M 9 Antikörper gefunden wurden. Innerhalb eines halben Jahres traten aber auch die die PBC beweisenden Anti M 2 Antikörper auf.

6.4. Patientin B.I. (Abb. 25)

Bei der Patientin B.I. (Jg. 1926) liegt ebenfalls ein gutartiger Verlauf einer PBC vor. Seit 1972 sind Oberbauchbeschwerden, eine erhöhte BSG und erhöhte IgM Spiegel bekannt. Transaminasen und AP waren normal.

1976 war der AMA Test positiv. Die Patientin hatte Anti M 2 Antikörper vom IgG Typ und einen hohen Anti M 9 Titer; die Anti M 9 Antikörper waren ebenfalls vom IgG Typ. Eine Leberbiopsie ergab eine PBC im Stadium I.

Ab 1977 begannen Transaminasen und AP anzusteigen. Nach Beginn der Imurek-Therapie 1978 fielen sie wieder auf Normalwerte ab, ebenso die Gammaglobuline. Nur das IgM blieb isoliert erhöht. Auch die Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper blieben durch die Therapie unbeeinflußt. Insgesamt unterlagen sie nur geringen Schwankungen.

6.5. Patientin W.E. (Abb. 26)

Abb. 26 stellt einen ausgesprochen ungünstigen Verlauf dar mit raschem Übergang von PBC II in PBC IV innerhalb von fünf Jahren und Exitus sechs Jahre nach Auftreten der ersten Symptome.

AP, GOT, GPT und Bilirubinwerte schwankten stark, konnten dann aber unter Steroidtherapie konstant gehalten werden. Nach Absetzen der Therapie stiegen AP und vor allem das Bilirubin wieder stark an.

Bei der Patientin konnten nur Anti M 2, keine Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden. Die Anti M 2 Antikörper vom IgG Typ zeigten keine großen Titerschwankungen, während die IgM-Anti M 2 Antikörper unter der Steroidtherapie sprunghaft anstiegen, dann konstant blieben und nach Absetzen der Therapie langsam wieder abfielen.

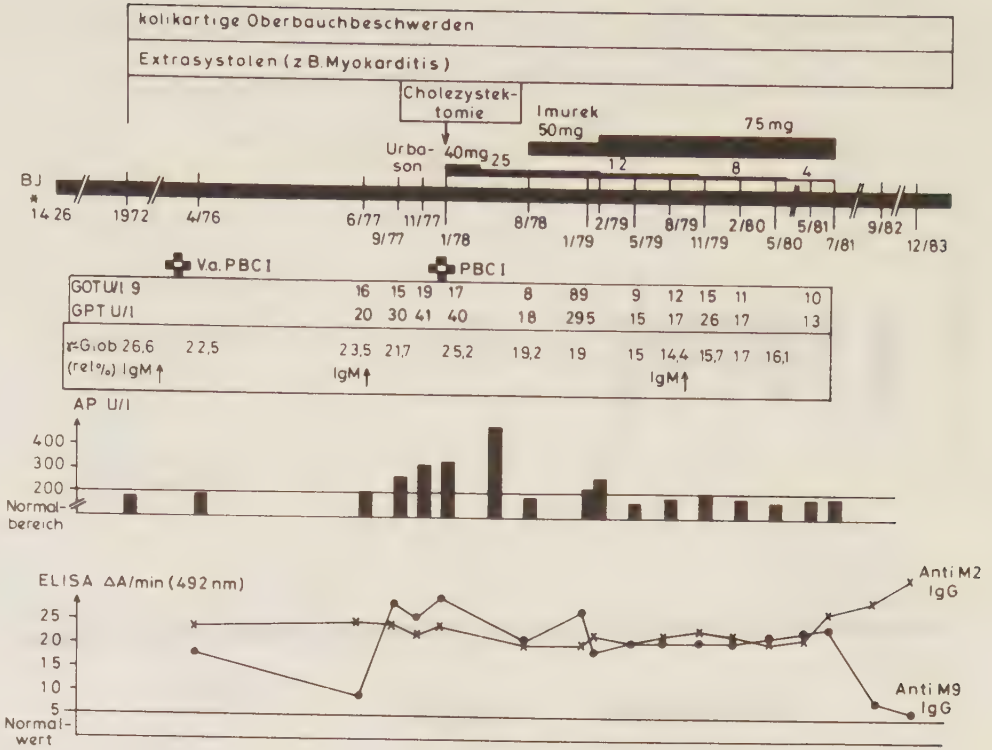

Abb. 25 Verlauf einer seit 11 Jahren im Stadium I persistierenden PBC bei einer Patientin mit Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern vom IgG Typ

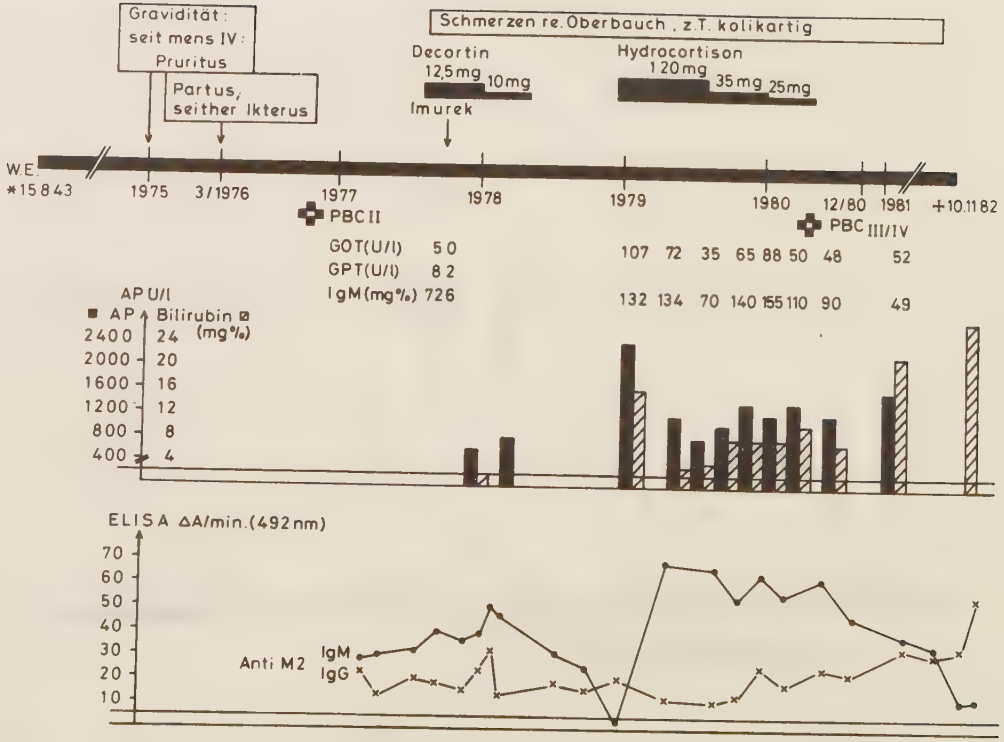

Abb. 26 Ungünstiger Verlauf einer PBC mit raschem Übergang von Stadium II in Stadium IV bei einer Patientin, die Anti M 2 positiv aber Anti M 9 negativ war

7. Autoantikörper bei Angehörigen von Patienten mit PBC

7.1. Literaturübersicht

Die familiäre Häufung der PBC ist immer wieder beobachtet worden (21, 22, 28, 32, 53, 55, 108), und auch bei gesunden Angehörigen von PBC Patienten wurden immunologische und biochemische Abnormalitäten beschrieben (34, 39, 91, 111).

Wie Tabelle 13 zeigt, hatten bis zu 33,2% der Angehörigen erhöhte IgM-, bis zu 15,4% erhöhte IgG- und bis zu 7,7% erhöhte IgA Spiegel.

Die alkalische Phosphatase war in bis zu 14% der gesunden Angehörigen erhöht; die Transaminasen waren in allen Fällen normal.

Auch Gewebeantikörper konnten nachgewiesen werden: ANA in etwa 16%, SMA in bis zu 11% und AMA in bis zu 7,4% der Angehörigen.

Tabelle 13 Biochemische und immunologische Abnormitäten bei Angehörigen von PBC Patienten in der Literatur im Vergleich zu eigenen Beobachtungen

Literatur	Autoantikörper Prozent positiv SMA	ANA	AMA	AP %pathologisch	Anzahl n auf Immunglobuline getestet	Immunglobuline gesamt %pathologisch	IgM	IgG	IgA
1. Galbraith et al. (39) n = 95	11	16	7,4	13	56	9,3	14	12,5	5,2
2. Feizi et al. (34) n = 125	5	13	7	-	92	-	3,3	6,5	3,3
3. Salaspuro et al. (91) n = 39	7,8	9,8	2,5	2,6	39	2,6	33,2	15,4	7,7
4. Kato et al. (55) n = 7	(57)	14	0	14	-	-	-	-	-
5. eigene Beobachtungen n = 63	2	14	0	7	63	-	3	14	14

In allen Studien wurde kein Zusammenhang zwischen pathologischen biochemischen Befunden und dem Auftreten von Autoantikörpern, insbesondere von AMA, gefunden

7.2. Eigene Beobachtungen

63 gesunde Angehörige (26 Männer, 37 Frauen) von 11 Patienten mit primär-biliärer Zirrhose wurden auf pathologische biochemische Parameter (AP, GOT, GPT), erhöhte Immunglobulinspiegel und auf Autoantikörper untersucht (Tabelle 13, 14).

Tabelle 14 Häufigkeit pathologischer biochemischer und immunologischer Befunde bei 63 Angehörigen von Patienten mit PBC

Parameter		pathologische Befunde (Prozent positiv)
1. biochemische Parameter		
	AP	7
	GOT	0
	GPT	0
2. Immunglobuline		
Erhöhung von	IgG	14
	IgM	3
	IgA	14
3. serologische Parameter		
	HBs Antikörper	20
Antikörper gegen	Sarkolemm	7
	Endothelien	4
	Kerne	13
	glatte Muskulatur	2
	Tubuli	4
	Schilddrüse	4
	Mitochondrien	0

Während GOT und GPT bei allen Angehörigen im Normalbereich lagen, war die alkalische Phosphatase in 7% der Fälle erhöht. Bis zu 14% zeigten eine Erhöhung der Immunglobuline.

Im Immunfluoreszenztest konnten bei 13% der Verwandten antinukleäre Antikörper, bei 2% Antikörper gegen glatte Muskulatur nachgewiesen werden. Diese Zahlen sind aber nicht signifikant, vergleicht man sie mit der Häufigkeit dieser Antikörper bei einer Kontrollgruppe von Normalpersonen entsprechender Alters- und Geschlechtsverteilung.

Keiner der 63 Angehörigen hatte AMA im Immunfluoreszenztest.

7.2.1. Untersuchung der Familien auf Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper im ELISA

Alle 63 Angehörigen sowie 11 Patienten mit PBC wurden im ELISA auf Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper getestet.

Anti M 2 Antikörper konnten wir nur bei den an PBC erkrankten Personen nachweisen, Anti M 9 Antikörper dagegen auch bei 57% der 63 gesunden Angehörigen (Tabelle 15). Interessanterweise konnten auch bei Ehemännern von PBC Patientinnen bzw. deren Geschwistern Anti M 9 Antikörper gefunden werden.

7.2.1.1. Darstellung der serologischen Befunde in den Familien A-H mit Hilfe von Stammbäumen

In Familie A (Abb. 27) hatten beide Zwillingsschwestern hohe Anti M 2, aber nur schwache Anti M 9 Antikörperaktivitäten. Bei 7 der 11 Kinder konnten ebenfalls Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden.

Tabelle 15 Häufigkeit von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern bei gesunden Personen, die in engem Kontakt zu PBC Patienten stehen

Personengruppen	Anzahl getestet	Anzahl (Prozent) positiv mit Anti M 2	Anti M 9
1. Angehörige von PBC Patienten (insgesamt)	63	0	36 (57)[x]
a) Eltern	4	0	3
b) Onkel und Tanten	3	0	3
c) Geschwister	12	0	7
d) Kinder	22	0	12
e) Nichten und Neffen	14	0	7
f) Enkel	7	0	5
2. Ehemänner/-frauen (insgesamt)	7	0	3 (43)
a) von PBC Patientinnen	4	0	2
b) von Angehörigen	3	0	1
3. Freunde und Freundinnen	6	0	2 (33)

[x] Relation Frauen: Männer = 2:1
Es wurde keine Korrelation zu irgendeinem HLA-Typ gefunden.

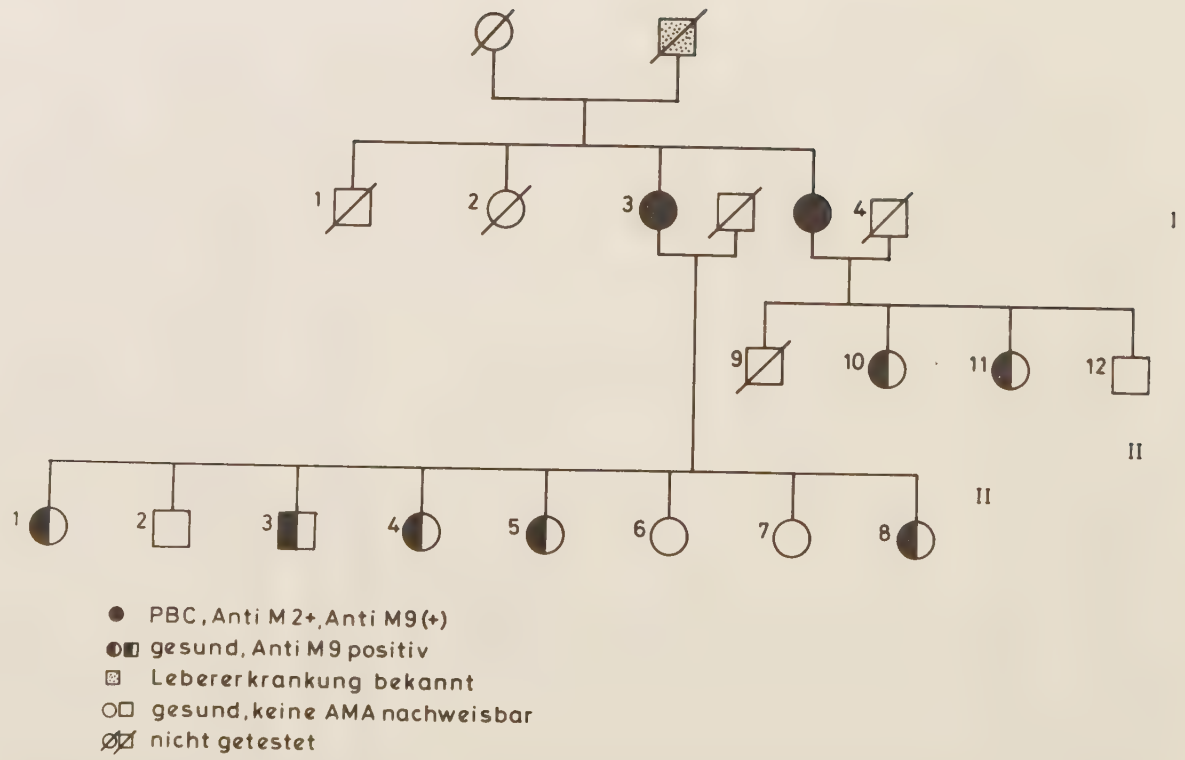

Abb. 27 Nachweis von Anti M 9 Antikörpern bei Kindern von eineiigen Zwillingsschwestern mit PBC im Stadium IV

In Familie B (Abb. 28) sind Mutter und zwei Töchter an PBC erkrankt. Alle drei haben Anti M 2 Antikörper, aber nur die beiden Töchter (II/2 und II/3) auch Anti M 9 Antikörper. Anti M 9 Antikörper konnten bis in die dritte Generation nachgewiesen werden und zwar bei fünf der sieben Enkel. Dazu gehören auch zwei der drei Kinder der gesunden Tochter (II/1), die ebenfalls Anti M 9 positiv ist.

Interessanterweise konnten sogar bei dem Ehemann der an PBC erkrankten Tochter II/3 Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden.

Auch in Familie C (Abb. 29) hatte der Ehemann der Patientin, die Anti M 2 und Anti M 9 positiv war, Anti M 9 Antikörper. In den Seren von beiden Kindern (II/15 und II/16) und von vier der acht Geschwister der Patientin konnten ebenfalls Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden. Die Kinder der Schwester I/6 wie auch deren Ehemann, die im gleichen Haus wie die Patientin wohnen, waren mit einer Ausnahme alle Anti M 9 positiv. Dagegen hatten weder die in Australien lebende Schwester I/12 noch Angehörige der Familie des Bruders I/10, die die Patientin nur selten sieht, Anti M 9 Antikörper.

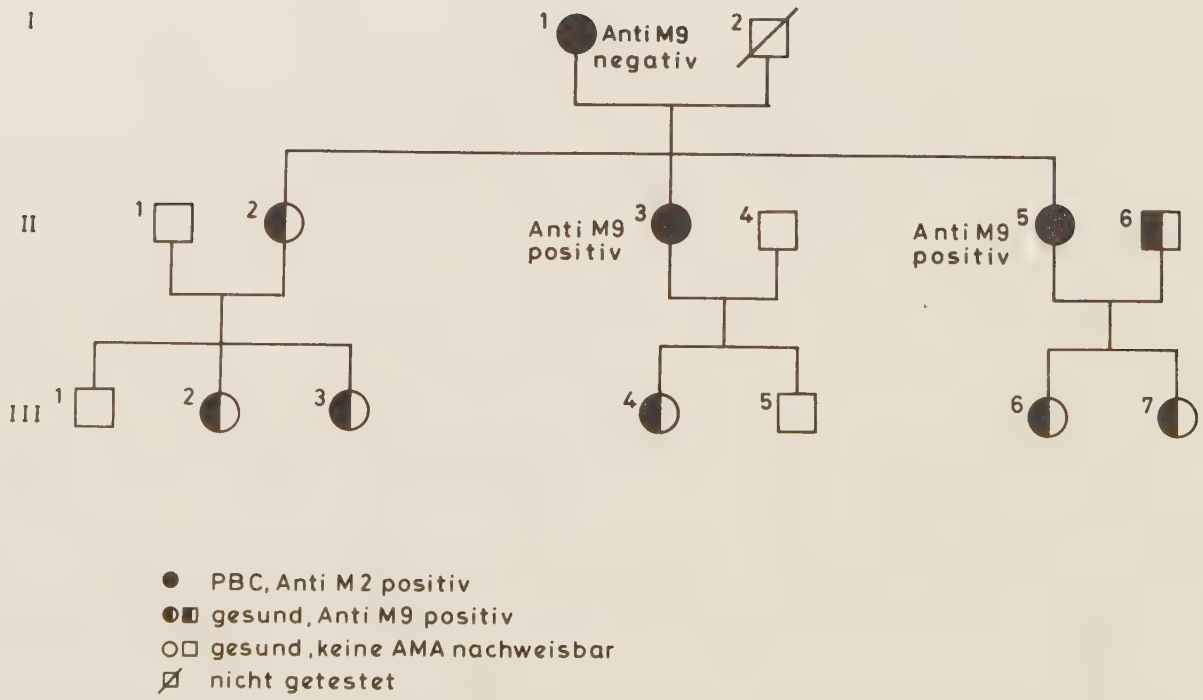

Abb. 28 Familie B: Nachweis von Anti M 9 Antikörpern in einer Familie, in der Mutter und zwei Töchter an PBC erkrankt sind

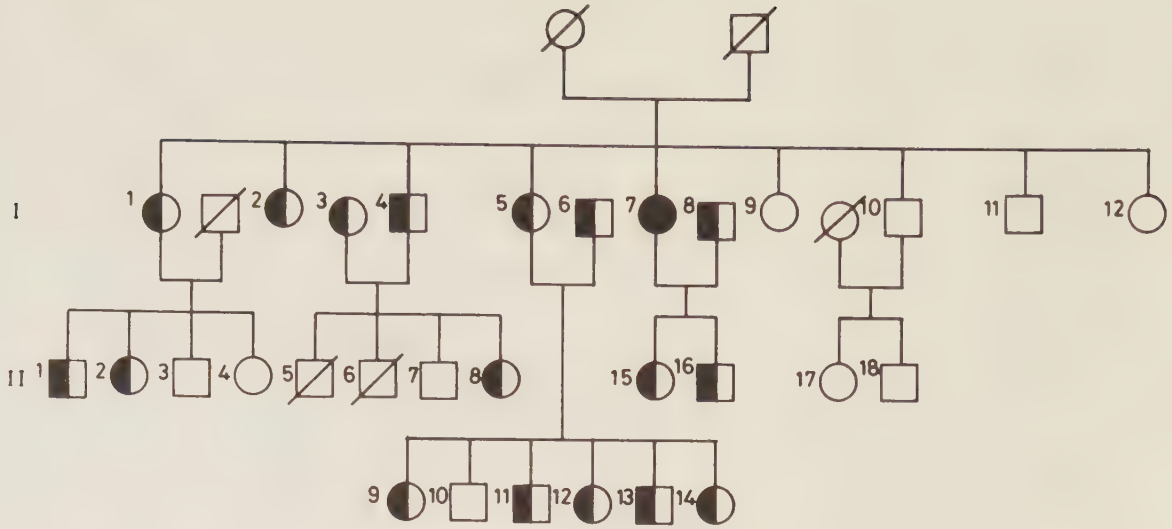

Abb. 29 Familie C: Häufigkeit von Anti M 9 Antikörpern bei Geschwistern einer PBC Patientin und deren Familien. Die Patientin hat häufig Kontakt zu den Familien der Schwestern I/1 und I/5. Die Schwester I/12 und die Familie des Bruders I/10 sieht sie nur selten.

Die Patientin in Familie D (Abb. 30) ist ebenfalls Anti M 2 und Anti M 9 positiv. Bei beiden Elternteilen der Patientin und bei allen Geschwistern der Eltern konnten wir Anti M 9 Antikörper nachweisen.

In Seren von zwei der sechs engen Freunde und Freundinnen der Patientin fanden wir Anti M 9 Antikörper. Zu diesen Anti M 9 positiven Personen hat die Patientin allerdings den geringsten Kontakt.

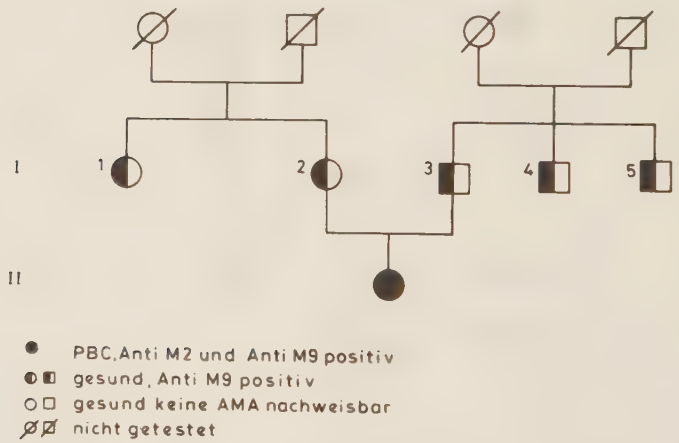

Abb.30 Familie D: Nachweis von Anti M 9 Antikörpern bei Eltern, Tante und Onkel einer Patientin mit PBC

In Familie E (Abb. 31) konnten nur bei der Tochter III/1 der Patientin Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden. Die Patientin selbst war Anti M 2 positiv, reagierte aber nur schwach mit Leber SMP.

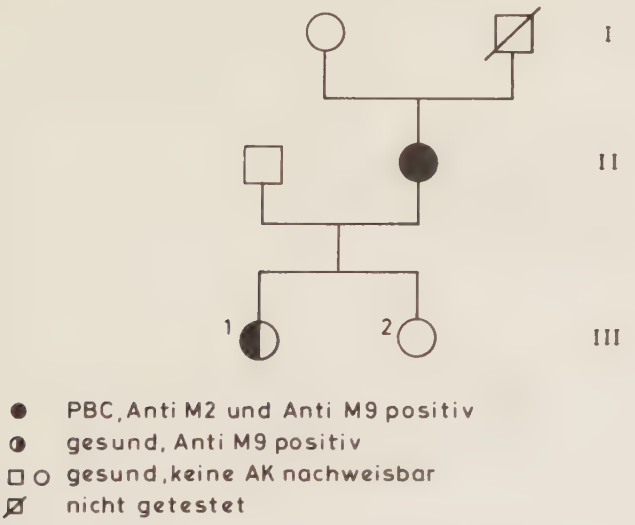

Abb. 31 Familie E: Anti M 9 Antikörper in der Familie einer Patientin mit PBC im Stadium I

In den Familien F (Abb. 32) und G (nicht dargestellt) hatten jeweils nur die Geschwister der Patientinnen leberspezifische Antikörper, die Kinder waren alle Anti M 9 negativ.

Die Patientin in Familie H (Abb. 33) hat Anti M 2 und Anti M 9 Antikörper. Bei Mutter und Tochter wurden ebenfalls Anti M 9 Antikörper gefunden.

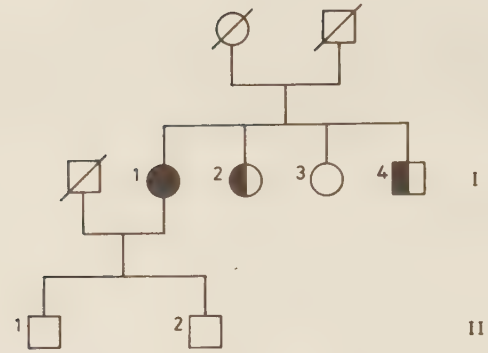

Abb. 32

Familie F

(Familie G nicht dargestellt)

● PBC, Anti M2 und Anti M9 positiv
◐◧ gesund, Anti M9 positiv
○□ gesund, keine AMA nachweisbar
⌀⌀ nicht getestet

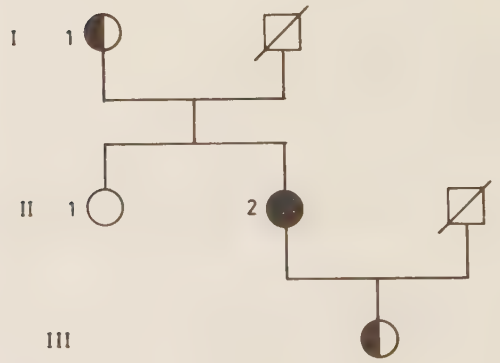

Abb. 33

Familie H: Nachweis von Anti M 9 bei Mutter und Tochter einer PBC Patientin

● PBC, Anti M2 und Anti M9 positiv
◑ gesund, Anti M9 positiv
○ gesund keine Antikörper nachweisbar
⌀ nicht getestet

7.2.1.2. Familie I (Abb.34)

Die Familie I aus den USA zeigt eindrücklich die familiäre Häufung der PBC. Ein Bruder der Patientin hatte PBC, Vater und Großvater der Patientin starben an Leberzirrhose, deren genaue Diagnose damals noch nicht möglich war. Die Vermutung liegt jedoch nahe, daß auch bei ihnen eine primär-biliäre Zirrhose vorlag.

Anti M 9 Antikörper konnten nur bei der Patientin selbst sowie bei einer Nichte nachgewiesen werden.

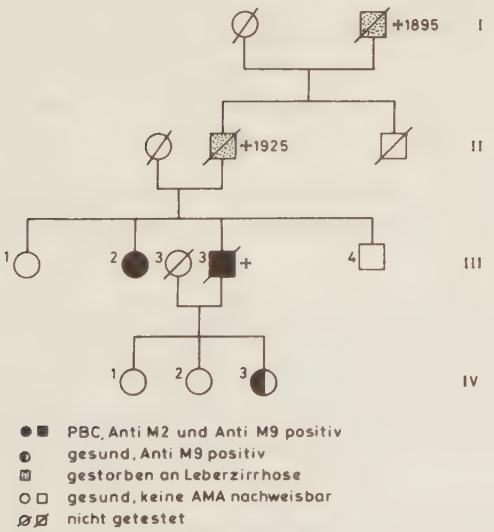

Abb. 34 Familie I: Familiäre Häufung der PBC

8. Untersuchung von Seren von medizinisch-technisch Angestellten (MTA) auf AMA

Die Beobachtung, daß auch Personen, die PBC Patienten nahe stehen, Anti M 9 positiv sein können, veranlaßte uns, auch Seren von Angestellten eines immunpathologischen Labors, die sehr viel mit Seren von PBC Patienten arbeiteten, auf Antikörper zu untersuchen.

Dazu wurden Seren von 16 MTA eines immunpathologischen Labors und zur Kontrolle von 27 MTA aus verschiedenen anderen Labors im ELISA auf Anti M 2 und Anti M 9 getestet.

10 der 16 MTA (63%) aus dem immunpathologischen Labor hatten Anti M 9 Antikörper im Gegensatz zu nur 17% der 29 MTA aus anderen Labors (Tabelle 16). Von den 10 Anti M 9 positiven MTA hatten 8 (80%) Anti M 9 Antikörper nur vom IgM und 2 gleichzeitig vom IgG und IgM Typ.

Pathologische biochemische Befunde (AP, GOT, GPT) oder Immunglobulinerhöhungen traten nicht auf.

Tabelle 16 Nachweis von Anti M 2 und Anti M 9 Antikörpern bei 45 medizinisch-technisch Angestellten aus verschiedenen Labors

Labor	Anzahl getestet	Häufigkeit von Anti M 2 Prozent (Anzahl) positiv	Anti M 9
a) immunpathologisches Labor	16	0	63 (10)[x]
b) andere Labors	29	0	17 (5)

x) Relation Frauen:Männer = 2:1
Es bestand keine Korrelation zu irgendeinem HLA-Typ (A,B,C,D)

Von drei Anti M 9 positiven MTA standen uns Seren im Verlauf seit Beginn ihrer Arbeit in dem immunpathologischen Labor zur Verfügung.

Die erste MTA hatte schon zu Beginn ihrer Arbeit in diesem Labor Anti M 9 Antikörper; sie hatte aber schon zuvor sehr viel mit Seren gearbeitet (Abb.35).

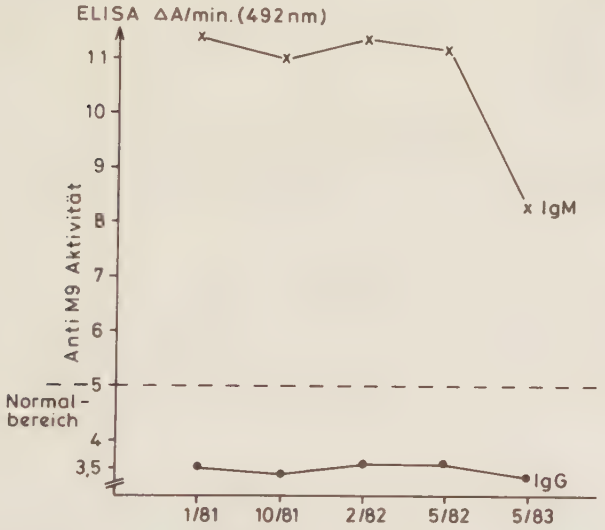

Abb. 35 Verlauf der Anti M 9 Aktivität bei einer MTA seit Beginn ihrer Arbeit im immunpathologischen Labor 1/81. Die MTA hatte schon früher viel mit Seren gearbeitet.

Die zweite MTA war zu Beginn ihrer Arbeit in dem Labor Anti M 9 negativ und bekam diese Antikörper erst im Laufe der Zeit. Sie waren bei ihr vorwiegend vom IgG Typ (Abb. 36)

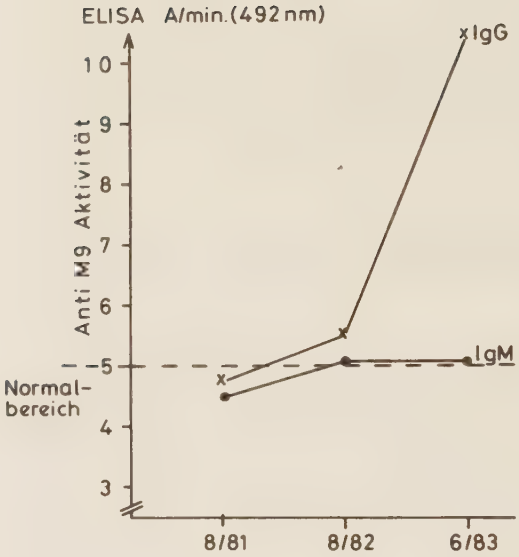

Abb. 36 Auftreten von Anti M 9 Antikörpern vom IgG Typ bei einer MTA während der Zeit ihrer Arbeit mit PBC Seren

Auch die dritte MTA wurde erst während ihrer Arbeit in dem immunpathologischen Labor Anti M 9 positiv. 6 Jahre, nachdem sie das Labor verlassen hatte, konnten allerdings keine Antikörper mehr nachgewiesen werden (Abb.37).

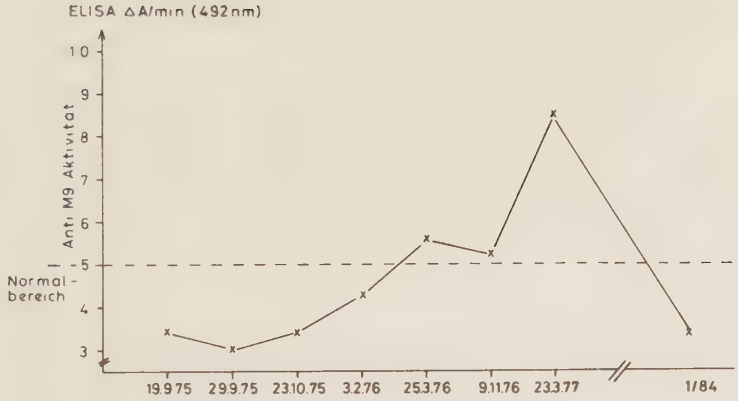

Abb. 37 Verlauf des Anti M 9 Antikörpertiters bei einer MTA während der Zeit ihrer Arbeit in dem immunpathologischen Labor und 6 Jahre nach Verlassen des Labors

9. Nachweis von komplementbindenden und präzipitierenden Antikörpern gegen M 9

Die Anti M 9 Antikörper bei gesunden Personen (Angehörige von PBC Patienten, MTA) waren nur im ELISA nachweisbar.

Dagegen hatten 24% der Anti M 9 positiven PBC Patienten komplementbindende Antikörper gegen M 9. Präzipitierende Anti M 9 Antikörper wurden nur in einigen wenigen Seren mit sehr hohen Anti M 9 Titern gefunden.

D. DISKUSSION

1. Verbesserung der serologischen Diagnose der PBC mit Hilfe des ELISA

Das Verständnis für die primär-biliäre Zirrhose ist in den letzten Jahren erheblich gewachsen, nicht zuletzt dadurch, daß die Krankheit heute früher erfaßt wird, oft noch in asymptomatischen Stadien. Das ist vor allem durch Einführung neuer diagnostischer Methoden möglich geworden.

Eine besondere Bedeutung in der Diagnose der PBC kommt heute den antimitochondrialen Antikörpern in Patientenseren zu. Nach der Entdeckung des spezifischen Antigens, mit dem nur PBC Seren reagieren, kann man sich jetzt mit großer Sicherheit auf die serologische Diagnose verlassen. Dieses zunächst in der KBR als komplementbindendes Antigen entdeckte M 2 Antigen kann sehr leicht aus Rinderherzmitochondrien isoliert werden (15, 66, 93). Die Sensitivität des Nachweises von Anti M 2 Antikörpern konnte nach Einführung des fluorometrischen Immunoassay (FIAX) bzw. des ELISA erheblich gegenüber der Komplementbindungsreaktion, des Immunfluoreszenztestes und der Immundiffusion gesteigert werden (59).

Die erhöhte Sensitivität des ELISA läßt sich darauf zurückführen, daß in dieser Methode auch andere Antikörper als komplementbindende oder präzipitierende Antikörper nachgewiesen werden können und man im Gegensatz zum Immunfluoreszenztest auch gereinigte Antigenfraktionen verwenden kann. Selbst bei geringsten Antigenkonzentrationen (maximal 50 g Protein/ml) und starken Serumverdünnungen (bis zu 1:4000) erhielt man im ELISA noch hohe Extinktionen, was auf eine hohe Antikörperbindung hinweist.

2. Unterschiede der Antigendeterminanten an Herz-, Leber- und Nierenmitochondrien

Aus der Beobachtung, daß Seren von Patienten mit PBC im ELISA unterschiedliche Antikörperaktivitäten mit den submitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherz, Schweineniere und Rattenleber ergaben, konnte man schließen, daß diese Seren noch andere AMA als Anti M 2 enthalten mußten. Insbesondere bestand keine Korrelation zwischen den Antikörpertitern mit Herz- und Leber SMP. Bei Absorptionsstudien stellte sich aber heraus, daß das M 2 Antigen nicht mehr an Leber SMP gebunden ist, während es die Haupt-Antigendeterminante der Herz SMP darstellt.

Die Mitochondrien der verschiedenen Organe scheinen sehr unterschiedlich auf dieselbe Behandlung zu reagieren. So löst sich nach Beschallen von Rattenlebermitochondrien das M 2 Antigen vollständig von der inneren Membran ab, während das Enzym, die ATPase, an den SMP gebunden bleibt. Diese Beobachtung bestätigt die schon früher festgestellte Dissoziation von Antigen- und Enzymaktivität (93).

Auch im Rattenleber SMP-SN war das Antigen nicht mehr an Membranen gebunden, da es nur im zweiten und dritten Peak nach säulenchromatographischer Auftrennung auftrat, nicht jedoch im ersten Peak, im Ausschlußvolumen. Dieser enthielt nur Antigene der äußeren Mitochondrienmembran (M 3, M 4, M 6, M 8). Damit war eine verhältnismäßig einfache und schnelle Methode zur Isolierung einer relativ reinen outer membrane Fraktion gegeben.

Im Gegensatz dazu war das M 2 Antigen fest an die innere Mitochondrienmembran von Rinderherz, Schweineniere und Rinderleber gebunden und ging beim Beschallen nur

zum Teil in den SMP-SN über; auch hier war es noch an Membranfragmente gekoppelt und erschien daher schon im ersten Peak nach Auftrennung des SMP-SN über eine Sepharose 6B-Säule.

Der SMP-SN aus humaner Leber enthielt M 2 nur in sehr geringer Konzentration. Säulenchromatographische Auftrennung ermöglichte aber eine Dissoziation von M 3 und M 4, da M 3 nur im ersten Peak, M 4 auch in der Fraktion des dritten Peaks vorkam.

3. Heterogenität der AMA bei der PBC

Da das M 2 Antigen durch Beschallen von Lebermitochondrien von der Membran abgelöst wurde, müssen Seren, die dennoch mit Leber SMP reagieren, ein weiteres Antigen erkennen. Durch Absorptionsstudien konnte zu den Anti M 2 Antikörpern noch ein weiterer Antikörpertyp in PBC Seren nachgewiesen werden, der nur mit Leber SMP reagierte und eine Kreuzreaktion mit Nieren SMP zeigen konnte. Da er eindeutig von den bisher bekannten AMA unterschieden werden konnte, wurde er Anti M 9 genannt.

Anti M 9 Antikörper scheinen gegen ein Antigen der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet zu sein und reagieren, wie Anti M 3, Anti M 4, Anti M 6, Anti M 8, aber auch Anti M 7 Antikörper, nicht mit Neurospora crassa Mitochondrien.

Auf Grund von Absorptionen weiterer PBC Seren erhielt man den Hinweis, daß sie noch andere AMA unterschiedlicher Spezifität enthalten müssen (57). Diese wurden aber nicht nur bei der PBC, sondern auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem systemischen Lupus erythematodes und der lupoiden Hepatitis gefunden und sind damit eher als Ausdruck der allgemeinen Immunstimulation zu werten.

Lindenborn-Fotinos (66) beobachtete, daß einige PBC Seren im Western Blot mit dem gereinigten M 2 Antigen bis zu fünf Banden gaben. Diese Heterogenität der Anti M 2 Antikörper würde erklären, warum Behandlung der ATPase Fraktion mit geringer Trypsinkonzentration in manchen Fällen die Antikörperaktivität zunächst steigert: diese sind gegen eine Determinante gerichtet, die erst durch höhere Trypsinkonzentrationen zerstört wird.

Auch Anti M 4 und Anti M 8 Antikörper, die gegen ein Nagarse-insensitives bzw. -sensitives Antigen der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet sind (17), kommen nur in Seren von Patienten mit PBC vor. Anti M 4 Antikörper werden bei Patienten mit chronisch cholestatischer Hepatitis (Mischform) (18), Anti M 8 Antikörper bei Patienten mit einer progressiv verlaufenden PBC gefunden (114). Sie sind damit vor allem prognostische Marker.

Einen weiteren Antikörper fanden Schultheiß et al. (97) in PBC Seren: einen organspezifischen Antikörper, der mit dem Adeninnukleotid Translokator (ANT) der inneren Membran von Lebermitochondrien reagiert. Sie konnten auch zeigen, daß es zu diesem Antikörpertyp, der sich an den ANT bindet, noch einen weiteren Typ geben muß, der in vitro den Adeninnukleotid Transport durch die innere Mitochondrienmembran hemmen kann (98). Damit wurde zum ersten Mal bei der PBC ein Antikörper nachgewiesen, der die Funktion der Mitochondrien stören und so eine pathogenetische Bedeutung haben könnte.

Eine solche Bedeutung kann für die Anti M 9 Antikörper mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, da sie gegen ein Antigen gerichtet sind, das mit der äußeren Mitochondrienmembran assoziiert ist und daher

keine funktionelle Bedeutung hat.

4. Klinische Bedeutung von Anti M 9

Wie aus der Arbeit hervorgeht, kommen Anti M 9 Antikörper besonders in Frühstadien vor und sind hier überwiegend vom IgM Typ. Aus ihrem Vorhandensein kann man auf einen gutartigen Verlauf der Erkrankung schließen.

Anti M 9 Antikörper kommen signifikant häufiger bei Patienten mit PBC vor als bei Patienten mit anderen Erkrankungen oder bei einer Kontrollgruppe gesunder Personen. Bei allen Patienten, bei denen andere Lebererkrankungen als die primär-biliäre Zirrhose diagnostiziert worden waren oder bei denen die genaue Diagnose der Lebererkrankung nicht möglich war, die aber Anti M 9 Antikörper hatten, konnte eine PBC auch morphologisch nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Es wäre durchaus möglich, daß bisher, z.B. auf Grund fehlender AMA im Immunfluoreszenztest, eine falsche Diagnose gestellt worden war, etwa die einer Non A Non B Hepatitis, oder daß die PBC von einer weiteren Lebererkrankung überlagert war. Dies würde die erhöhten Bilirubinwerte bei 13% der Anti M 9 positiven Fälle erklären. Auffallend war, daß bei sehr vielen dieser Patienten histologisch eine Verfettung der Leber festgestellt wurde. Bei der Konstellation Anti M 9 Antikörper - Verfettung der Leber sollte man daher immer eine sehr frühe Form der PBC diskutieren; es wurde auch beobachtet, daß im Verlauf zu Anti M 9 Anti M 2 Antikörper hinzukommen können.

Das gehäufte Auftreten von Anti M 9 Antikörpern bei Angehörigen von PBC Patienten könnte für eine genetische Disposition sprechen; ebenso die anderen immunologischen und biochemischen Abnormitäten, die in dieser Gruppe

auch schon früher beschrieben worden sind (34, 39, 55, 104). Es wurde allerdings keine Assoziation zu einem HLA-Typ gefunden. Auch in der Literatur fand man bisher keine eindeutige Assoziation der PBC mit einem der HLA-Antigene A, B oder C (38, 45). In einem neueren Bericht jedoch wurde ein gehäuftes Vorkommen des DRw3 Antigens beschrieben (31), das allerdings auch mit anderen Erkrankungen mit gestörter Immunantwort assoziiert ist.

Gegen die genetische Disposition spricht, daß Anti M 9 Antikörper bei Personen gehäuft vorkommen, die in engem Kontakt zu den PBC Patienten stehen, wie Ehemänner oder Freunde und Freundinnen. Auch Angehörige, die oft mit den Patienten zusammen waren, hatten häufiger Anti M 9 Antikörper als die, mit denen der Kontakt nur lose war.

Auffallend war auch, daß 63% der MTA, die viel mit PBC Seren arbeiteten, Anti M 9 positiv waren. Zwei dieser MTA waren zu Beginn ihrer Arbeit mit diesen Seren Anti M 9 negativ und bekamen diese Antikörper erst im Laufe der Zeit, die eine MTA verlor sie wieder, nachdem sie das immunpathologische Labor verlassen hatte.

Diese Beobachtungen deuten stark auf die Existenz eines infektiösen Agens hin, das die Produktion eines protektiven Antikörpers induzieren könnte. Es bleibt allerdings noch ungeklärt, warum sich bei der einen Anti M 9 positiven Gruppe eine PBC ausbildet, bei der anderen jedoch nicht. Diese Susceptibilität könnte durchaus genetisch bedingt sein, zumal gezeigt wurde, daß Anti M 9 Antikörper bei Frauen und Männern fast gleich häufig vorkommen, aber vorwiegend Frauen an PBC erkranken.

Außerdem scheint es von Bedeutung zu sein, ob die Anti

M 9 Antikörper Komplement binden, da komplementbindende Anti M 9 Antikörper nur bei erkrankten Personen vorkamen, nicht aber bei den gesunden Anti M 9 positiven Familienmitgliedern oder MTA.

Verschiedene Befunde wie die Kreuzreaktion mit Nieren SMP oder die Reaktion mit verschiedenen Dichtegradientenstufen lassen die Vermutung aufkommen, daß auch die Gruppe der Anti M 9 Antikörper, wie die der Anti M 2 Antikörper (65), nicht einheitlich ist und daß verschiedene Untergruppen differenziert werden müssen. Vielleicht sind die Anti M 9 Antikörper in Seren von gesunden Personen gegen andere Determinanten gerichtet als die in Seren von PBC Patienten. Diese Frage muß mit Hilfe des Western Blot geklärt werden.

Ebenso muß noch geklärt werden, ob die Anti M 9 Antikörper überhaupt mit Mitochondrien aus Hepatozyten reagieren oder ob sie nicht vielmehr gegen Mitochondrien aus Epithelzellen der Gallengänge gerichtet sind, da beide Typen bei der Präparation der Mitochondrien aus Leber nicht getrennt werden.

So wurden früher in der IFL Antikörper gegen Gallengangsantigene bei 35% der PBC Patienten nachgewiesen (26, 27, 73). Diese Reaktion konnte allerdings auch bei anderen Lebererkrankungen wie z.B. bei der akuten Hepatitis, der kryptogenen Zirrhose und der HBsAg negativen chronisch aktiven Hepatitis und bei einer Vielzahl nicht hepatischer Erkrankungen beobachtet werden (1, 67).

In vitro fand man bei Patienten mit PBC eine Hemmung der Leukozyten-Migration als Antwort auf eine Proteinfraktion, die aus menschlicher Galle isoliert wurde (70). Diese Fraktion enthielt drei Antigene, die sich von Plasmaproteinen unterschieden. Davon schienen zwei

von intrahepatischen Gallengängen abzustammen: eines war mit dem Gallenkapillaren-Anteil der Hepatozytenmembran (kanalikuläres Antigen) und das andere mit Membranen der Epithelzellen von interlobulären und septalen Gallengängen assoziiert.

Ein Galleprotein wurde zugleich an Zellen des Ausführungsganges der Glandula submaxillaris, an Zellen der Milz und der Schilddrüse nachgewiesen (115). Kaninchen, denen dieses Protein injiziert worden war, entwickelten eine chronisch nicht eitrige destruierende Cholangitis (56).

Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß auch aus Schweinegalle die Antigene isoliert werden können, die spezifisch für die PBC sind, nämlich M 2, M 4, M 8 und M 9, nur M 1 war noch in geringer Konzentration enthalten (58).

Sieht man die Anti M 9 Antikörper als Hinweis auf ein infektiöses Agens an, so erhebt sich die Frage, warum nur 40% der PBC Patienten diese Antikörper haben. Es ist jedoch bekannt, daß bei der PBC Immunkomplexe sehr häufig vorkommen, und es wurde auch beschrieben, daß diese Immunkomplexe Antigene der Galle enthalten (6). Ebenso konnten antimitochondriale Antikörper in diesen Immunkomplexen nachgewiesen werden (83), so daß man der Frage nachgehen muß, ob sie nicht auch Anti M 9 Antikörper bzw. das M 9 Antigen enthalten.

5. Hypothesen und Aspekte im Hinblick auf die Ätiologie der PBC

Wenn die Produktion der Anti M 9 Antikörper durch ein infektiöses Agens induziert wird, könnte man diskutieren, ob sie über Oberflächenrezeptoren an Hepatozyten gebunden (5), durch die Zelle hindurchtransportiert und in die Galle sezerniert werden. Hier zeigen sie eine Kreuzreaktion mit Antigenen der Gallenkapillaren oder -gänge. Diese werden dadurch zerstört, insbesondere, wenn die Anti M 9 Antikörper Komplement binden.

Da aber viele Normalpersonen Anti M 9 Antikörper ohne Zeichen einer PBC haben, muß man annehmen, daß der Transport der Antikörper in die Galle nur bei disponierten Personen geschieht, entweder bei genetischer Prädisposition oder nach Änderung der Hepatozytenoberfläche durch Medikamente und andere Einflüsse (40, 51, 86).

Nicht nur das sekretorische System der Leber ist jedoch bei der PBC gestört, auch die Tränen- und Speichelsekretion ist stark vermindert; das hat zu der Bezeichnung "dry gland" Erkrankung geführt (30). Hierfür wurde eine Zerstörung der Tränen- und Speicheldrüsengangszellen verantwortlich gemacht, die auf demselben Mechanismus beruht wie die Zerstörung der Gallengangsepithelien.

Es wäre nachzuprüfen, ob sich das M 9 Antigen auch an Tränen- und Speicheldrüsenzellen oder in der Tränenflüssigkeit oder im Speichel befindet.

Anti M 9 könnte folglich ein Antikörper sein, mit dessen Hilfe es eines Tages vielleicht gelingt, Licht in das Dunkel um die Ätiologie der primär-biliären Zirrhose zu bringen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß 97% der Seren von Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC) organunspezifische antimitochondriale Antikörper (AMA) enthalten, die mit dem ATPase assoziierten Antigen M 2 reagieren.

Durch Absorption von PBC Seren mit submitochondrialen Partikeln (SMP) aus Rinderherz, Rattenleber und Schweineniere konnten wir auch organspezifische Antikörper nachweisen, die mit einer Protease-insensitiven Determinante an Leber SMP reagierten. Diese Antikörper, die gegen ein Antigen der äußeren Mitochondrienmembran gerichtet waren, unterschieden sich eindeutig von den bisher bekannten AMA mit Anti M 1 - Anti M 8 Spezifität sowie von den kürzlich beschriebenen ebenfalls organspezifischen Antikörpern gegen den Adeninnukleotid Translokator (ANT) an Lebermitochondrien. Sie wurden daher Anti M 9 genannt.

67 von 171 Patienten mit PBC reagierten im ELISA mit dem M 9 Antigen. Die Anti M 9 Antikörper kamen häufiger in frühen als in späten Stadien der PBC vor und waren in den Frühstadien vorwiegend vom IgM Typ.

Auch 63 Angehörige (Eltern, Onkel, Tanten, Geschwister, Nichten, Neffen, Kinder und Enkel), 7 Ehemänner und 6 Freunde und Freundinnen von PBC Patientinnen wurden auf Anti M 9 getestet. 36 der 63 Verwandten (57%), 3 Ehemänner und 2 Freunde hatten Anti M 9 Antikörper entweder vom IgG oder vom IgM Typ, aber keines der Seren reagierte mit M 2.

Als Kontrollen wurden Seren von 793 Patienten mit verschiedenen hepatischen und nicht hepatischen Erkrankungen und von 100 Blutspendern untersucht. 16% waren

Anti M 9 positiv. Bei keinem von 45 Anti M 9 positiven Patienten mit verschiedenen Lebererkrankungen konnte eine PBC mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Testete man Seren von 16 Angestellten eines immunpathologischen Labors, die mit PBC Seren arbeiteten, so konnten bei 10 (63%) Anti M 9 Antikörper nachgewiesen werden, im Gegensatz zu 5 von 29 Angestellten (17%) aus anderen Labors.

Diese Beobachtungen bestätigen frühere Befunde, daß Anti M 2 Antikörper ein wichtiger diagnostischer Marker für die serologische Diagnose der PBC sind. Anti M 9 Antikörper dagegen, die sowohl bei PBC Patienten gehäuft vorkommen als auch bei Personen, die in engem Kontakt zu diesen Patienten stehen oder mit deren Seren arbeiten, könnten auf ein infektiöses Agens hinweisen, das die Produktion dieser Antikörper induziert.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ablin, R.J., Bush, I.M., Guinan, P., Dubin, A. (1974) Bile canaliculi antibodies: benign or pathological ? (Letter). Lancet I, 33-34

2. Addison, T., Gull, W. (1851) On a certain affection of the skin-vitiligoidea-β-plana B-tuberose. Guys Hospital Reports 7, 265-277

3. Ahrens, E.H., Rayne, M.A., Kunkel, E.G., Eisenmenger, W.J., Blondheim, S.J.H. (1950) Primary biliary cirrhosis. Medicine (Baltimore) 29, 299-364

4. Alarcón-Segovia, D., Diaz-Jouanen, E., Fishbein, E. (1973) Features of Sjögren's syndrome in primary biliary cirrhosis. Ann. Intern. Med. 79, 31-36

5. Alarcón-Segovia, D., Ruis-Arguelles, A., Fishbein, E. (1977) Antibody to nuclear ribonucleoprotein penetrates live human mononuclear cells through Fc receptors. Nature 271, 67-69

6. Amoroso, P., Vergani, D., Wojzicka, B.M., MacFarlane, I.G., Eddlestone, A.L.W.E., Tee, D.E.H., Williams, R. (1980) Identification of biliary antigens in circulating immune complexes in primary biliary cirrhosis. Clin. Exp.Immunol. 42, 95-98

7. Baginski, E.S., Foa, P.P., Zak, B. (1974) Glucose-6-Phosphatase. In: Bergmeyer: Methoden der enzymatischen Analyse, 909-913

8. Baum, H., Berg, P.A. (1981) The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis. In: Jones, E.A., Seminars in liver disease 4, New York: Thieme Stratton Inc. 309-321

9. Beechey, R.B., Hubbard, S.A., Linnett, P.E., Mitchell, A.D., Munn, E.A. (1975) A simple and rapid method for the preparation of adenosine triphosphatase from submitochondrial particles. Biochem. J. 148, 533-537

10. Behrens, U.J., Hollander, V.P. (1976) Cell membrane sialoglycopeptides of corticoid-sensitive and -resistant lymphosarcoma P 1798. Cancer Res. 36, 172-180

11. Berg, P.A., Baum, H. (1980) The serology of primary biliary cirrhosis. In: Miescher, P.A., Müller-Eberhard, H.J.: Springer Seminars in Immunopathology; New York, Springer 3, 355-373

12. Berg, P.A., Doniach, D., Roitt, I.M. (1967) Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis I: Localization of the antigen to mitochondrial membranes. J. exp. Med. 126, 277-290

13. Berg, P.A., Homberg, J.C., Botazzo, G.F., Doniach, D. (1981) Clinical significance of mitochondrial antibodies in relation to liver disease. Lancet II, 804

14. Berg, P.A., Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., Klöppel, G. (1982) ATPase associated antigen (M 2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet II, 1423-1426

15. Berg, P.A., Roitt, I.M., Doniach, D., Cooper, H.M. (1969) Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis IV. Significance of membrane structure for the complement fixing antigen. Immunology 17, 281- 293

16. Berg, P.A., Stechemesser, E., Strienz, J. (1981) Hypergammaglobulinämische chronisch aktive Hepatitis mit Nachweis von Leber-Pankreas-spezifischen komplementbindenden Autoantikörpern. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 87, 921-927

17. Berg, P.A., Weber, P., Oehring, J., Lindenborn-Fotinos, J., Stechemesser, E. (1984) Significance of different types of mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis Festschrift zum 80. Geburtstag von Prof. H. Popper, Wien 1983 (zur Publikation angenommen)

18. Berg, P.A., Wiedmann, K.-H., Sayers, T.J., Klöppel, G., Lindner, H. (1980) Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the use of two different types of antimitochondrial antibodies. Lancet II, 1329-1332

19. Bianchi, F.P., Penfold, P.L., Roitt, I.M. (1973) Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis. Br. J. Exp. Pathol. 54, 652-657

20. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254

21. Brown, R., Clark, M.L., Doniach, D. (1975) Primary biliary cirrhosis in brothers. Postgrad. Med. J. 51, 110-115

22. Chohan, M.R. (1973) Primary biliary cirrhosis in twin sisters. Gut 14, 213-214

23. Christensen, E., Crowe, J., Doniach, D., Popper, H., Ranek, L., Rodés, J., Tygstrup, N., Williams, R. (1980) Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients. Gastroenterology 78, 236-246

24. Clarke, A.K., Galbraith, R.M., Hamilton, E.B.D., Williams, R. (1978) Rheumatic disorders in primary biliary cirrhosis. Ann. Rheum. Dis. 37, 42-47

25. Crowe, J.P., Christensen, E., Butler, J., Wheeler, P., Doniach, D., Keenan, J., Williams, R. (1980) Primary biliary cirrhosis: the prevalence of hypothyroidism and its relationship to thyroid antibodies and sicca syndrome. Gastroenterology 78, 1437-1441

26. Diederichsen, H. (1969) Heteroantibody against bile canaliculi in patients with chronic, clinically active hepatitis. Acta Med. Scand. 186, 299-302

27. Diederichsen, H. (1975) Bile canalicular antibodies in non hepatic diseases. Lancet I, 1142-1143

28. Douglas, J.G., Finlayson, N.D.C. (1979) Are increased individual susceptibility and environmental factors both necessary for the development of primary biliary cirrhosis? Br. Med. J. 2, 419-420

29. Engvall, E. (1980) Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. Meth. Enzymol. 70, 419-439

30. Epstein, O., Thomas, H.C., Sherlock, S. (1980) Primary biliary cirrhosis is a "dry gland" syndrome with features of chronic graft versus host (GVD) disease. Lancet I, 1166-1168

31. Ercilla, G., Pares, A., Arriaga, F., Bruguera, M., Castillo, R., Rodés, J., Vives, J. (1979) Primary biliary cirrhosis associated with HLA-DRw3. Tissue Antigens 14, 449-452

32. Fagan, E., Williams, R., Cox, S. (1977) Primary biliary cirrhosis in mother and daughter. Br. Med. J. 2, 1195

33. Fakunle, Y.M., de Villiers, D., Thomas, H.C., Sherlock, S. (1979) Monomeric IgM in chronic liver disease. Clin.Exp. Immunol. 38, 204-210

34. Feizi, T., Naccarato, R., Sherlock, S., Doniach, D. (1972) Mitochondrial and other tissue antibodies in relatives of patients with primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 10, 609-622

35. Fleming, C.R., Ledwig, J., Dickson, E.R. (1978) Asymptomatic primary biliary cirrhosis: presentation, histology, and results with D-penicillamine. Mayo Cli. Proc. 53, 587-593

36. Fox, R.A., James, D.G., Scheuer, P.J., Sharma, O., Sherlock, S. (1969) Impaired delayed hypersensitivity in primary biliary cirrhosis. Lancet I, 959-962

37. Fox, R.A., Dudley, F.J., Sherlock, S. (1973) Primary immune response to haemocyanin in patients with primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 14, 473-480

38. Galbraith, R.M., Eddleston, A.L.W.F., Smith, M.G.M., Williams, R., MacSween, R.N.M., Watkinson, G., Dick, H., Kennedy, L.A., Batchelor, J.R. (1974) Histocompatibility antigens in active chronic hepatitis and primary biliary cirrhosis. N.Engl. J. Med. 290, 63-69

40. Glober, G.A., Wilkerson, J.A. (1968) Biliary cirrhosis following the administration of methyltestosterone. JAMA 204, 170-173

41. Golding, P.L., Brown, R., Mason, A.M.S., Taylor, E. (1970) Sicca complex in liver disease. Br. Med. J. 4, 340-342

42. Grob, P.J., Müller-Schoop, J.W., Häckl, M.A., Joller-Jemelke, H.J. (1975) Drug-induced Pseudolupus. Lancet II, 144-148

43. Gupta, R.C., Dickson, E.R., Mac Duffie, F.C., Baggenstoss, A.H. (1978) Circulating IgG complexes in primary biliary cirrhosis: a serial study in forty patients followed for two years. Clin. Exp. Immunol. 34, 19-27

44. Hamblin, T.J. (1981) Significance of antimitochondrial antibodies. Lancet II, 1411-1412

45. Hamlyn, A.N., Adams, D., Sherlock, S. (1980) Primary or secondary sicca complex? Investigation in primary biliary cirrhosis by histocompatibility testing. Br. Med. J. 281, 425-426

46. Hamlyn, A.N., Macklon, A.M., James, O. (1983) (Abstract) Primary biliary cirrhosis (PBC): controlled study of epidemicity and symptome onset seasonality. Gut 21, A 899

47. Hanot, V. (1876) Etude sur une forme de cirrhose hypertrophique du fois (cirrhose hypertrophique avec ictere chronique). Paris, J.B. Balliere

48. Hislop, W.S. (1980) Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study (letter). Br. Med. J. 281, 1069-1070

49. Hodges, I.R., Hall, A.J., Wright, R. (1981) Primary biliary cirrhosis and mitochondrial antibodies. Lancet II, 362

50. Homberg, J.C., Stelly, C., Andreis, I., Abuaf, N., Saadoun, F., André, J. (1982) A new antimitochondrial antibody (anti M 6) in iproniazid induced hepatitis. Clin. Exp. Immunol. 47, 93-102

51. Ishak, K.L., Irey, N.S. (1972) Hepatic injury associated with the phenothiazines: Clinicopathologic and follow-up study of 36 patients Arch. Pathol. 93, 283-304

52. James, S.P. (1983) Conclusion p. 510 In: James, S.P., moderator. Primary biliary cirrhosis: a model autoimmune disease. Ann. Intern. Med. 99, 500-512

53. Jaup, B.H., Zettergren, L.S.W. (1980) Familial occurrence of primary biliary cirrhosis associated with hypergammaglobulinemia in descendents: a family study. Gastroenterology 78, 549-555

54. Johnson, G.D., Holborow, E.J., Glynn, L.E. (1965) Antibody to smooth muscle in patients with liver disease. Lancet II, 878-879

55. Kato, Y., Suzuki, K., Kumagai, M., Nishimura, K., Miyamori, H., Kobayashi, K., Hattori, N., Nakanuma, Y. (1981) Familial primary biliary cirrhosis. Am. J. Gastr. 75, 188-191

56. Kawai, K., Kitagawa, H., Higashimori, T., Matsui, T., Fujiyama, S., Monna, T., Yamamoto, S., Morisawa, S. (1980) Experimental chronic non-suppurative destructive cholangitis in rabbits following immunization with bile duct antigens. Gastroenterol. Jpn. 15, 337-345

57. Klein, R. (1982) Unveröffentlichte Beobachtung

58. Klein, R. (1983) Unveröffentlichte Beobachtung

59. Klein, R., Lindenborn-Fotinos, J., Berg, P.A. (1983) Use of ATPase-associated antigen (M 2) for detection of antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis by fluorometric immunoassay. J. Immunol. Meth. 64, 227-238

60. Klein, R., Maisch, B., Kochsiek, K., Berg, P.A. (1984) Demonstration of organ specific antibodies against heart mitochondria (anti M 7) in sera from patients with some forms of heart diseases. Clin. Exp. Immunol. (zur Publikation angenommen)

61. Klöppel, G., Kirchhof, M., Berg, P.A. (1982) Natural course of PBC I. A morphological, clinical and serological analysis of 103 cases Liver 2, 141-151

62. Klöppel, G., Seifert, G., Lindner, H., Dammermann, R., Sack, H.J., Berg, P.A. (1977) Histopathological features in mixed types of chronic aggressive hepatitis and primary biliary cirrhosis. Virchows Arch. A 373, 143-160

63. Labro, M.T., Andrieu, M.C., Weber, M., Homberg, J.C. (1978) A new pattern of non-organ- and non-species-specific anti-organelle antibody detected by immunofluorescence: the mitochondrial antibody number 5. Clin. Exp. Immunol. 31, 357-366

64. Lauritsen, K., Diederichsen, H. (1981) Antimitochondrial antibodies - specific for what? Lancet II, 1172-1173

65. Lindenborn-Fotinos, J. (1984) Persönliche Mitteilung

66. Lindenborn-Fotinos, J., Sayers, T.J., Berg, P.A. (1982) Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis VI. Association of the complementfixing antigen with a component of the mitochondrial F1-ATPase complex. Clin. Exp. Immunol. 50, 267-274

67. Linder, E., Miettinen, A., Kurki, P., Alfton, O. (1974) Liver-specific bile canalicular antibodies (Letter). Lancet II, 1275

68. Lindner, H., Dammermann, R., Kirchhof, M., Weber, D., Berg, P.A., Klöppel, G. (1977) Cholestatische Leberzirrhose mit Autoimmunphänomenen bei eineiigen Zwillingsschwestern. Ztsch. f. Gastroenterologie 15, 258-260

69. Long, R.G., Scheuer, P.J., Sherlock, S. (1977) Presentation and course of asymptomatic primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 72, 1204-1207

70. MacFarlane, I.G., Wojzicka, B.M., Tsantoulas, D.C., Portmann, B., Eddlestone, A.L.W.F., Williams, R. (1979) Leukocyte migration inhibition in response to biliary antigens in primary biliary cirrhosis, sclerosing cholangitis and other chronic liver diseases. Gastroenterology 76, 13333-1340

71. Mackay, I.R. (1958) Primary biliary cirrhosis showing a high titre of autoantibody: report of a case. N. Engl. J. Med. 258, 185-187

72. Mackay, I.R., Ritts, R.E. (1979) WHO handbook of immunological techniques. Geneva: World Health Organization

73. MacSween, R.N.M., Armstrong, E.M., Gray, K.G., Mason, M. (1973) Bile canalicular antibody in primary biliary cirrhosis and other liver diseases. Lancet I, 1419-1421

74. MacSween, R.N.M., Ber, P.A. (1976) Autoimmune diseases of the liver In: Ferguson, A., MacSween, R.N.M.: Immunopathological aspects of the liver and gastrointestinal tract Baltimore: University Park Press, 345-386

75. MacSween, R.N.M., Thomas, M.A. (1973) Lymphocyte transformation by phytohaemagglutinin (PHA) and purified protein derivative (PPD) in primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 15, 523-533

76. Mancini, G., Carbonara, A.O., Heremans, J.F. (1965) Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Int. J. Immunochem. 2, 235-246

77. Marx, W.J., o'Connell, D.J. (1979) Arthritis of primary biliary cirrhosis. Arch. Intern. Med. 139, 213-216

78. Miller, K.B., Sepersky, R.A., Brown, K.M., Goldberg, M.J., Kaplan, M.M. (1983) Genetic abnormalities of immunoregulation in primary biliary cirrhosis. Am. J. Med. 75, 75-80

79. Mitchell, R.H., Hawthorne, J.N. (1965) The site of diphosphoinosite synthesis in rat liver. Biochem. Biophys. Acta 196, 1-15

80. Miyachi, K., Gupta, R.C., Dickson, E.R., Tan, E.M. (1980) Precipitating antibodies to mitochondrial antigens in patients with primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 39, 599-606

81. Munoz, L.E., Thomas, H.C., Scheuer, P.J., Doniach, D., Sherlock, S. (1981) Is mitochondrial antibody a diagnostic marker of primary biliary cirrhosis? Gut 22, 136-140

82. Murray-Lyon, I.M., Thompson, R.P.H., Ansell, I.D., Williams, R. (1970) Scleroderma and primary biliary cirrhosis. Br. Med. J. 1, 258-259

83. Penner, E.H., Goldenberg, H., Albini, B., Weiser, M.M., Milgram, F. (1982) Immune complexes in primary biliary cirrhosis contain mitochondrial antigens. Clin. Immunol. Immunopathol. 22, 394-399

84. Potter, B.J., Elias, E., Jons, E.A. (1976) Hypercatabolism of the third component of complement in patients with primary biliary cirrhosis. J. Lab. Clin. Med. 88, 427-439

85. Ray, T.K. (1970) A modified method for the isolation of the plasma membranes from rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21, 333-345

86. Read, A.E., Harrison, C.V., Sherlock, S. (1961) Chronic chlorpromazine jaundice with particular reference to its relationship to primary biliary cirrhosis. Am. J. Med. 31, 249-254

87. Reynolds, T.B., Denison, E.K., Frankl, H.D. (1971) Primary biliary cirrhosis with scleroderma, Raynaud's phenomenon and teleangiectasia. Am. J. Med. 50, 302-312

88. Rizzetto, M., Swana, G., Doniach, D. (1973) Microsomal antibodies in chronic active hepatitis and other disorders. Clin. Exp. Immunol. 15, 331-339

89. Roll, J., Boyer, J.L., Barry, D., Klatskin, G. (1983) The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis. N. Engl. J. Med. 308, 1-7

90. Rubin, E., Schaffner, F., Popper, H. (1965) Primary biliary cirrhosis: Chronic non suppurative destructive cholangitis. Am. J. Pathol. 46, 387-407

91. Salaspuro, M.P., Laitinen, O.I., Lehtola, J., Makkonen, H., Räsänen, J.A., Sipponen, P. (1976) Immunological parameters, viral antibodies, and biochemical and histological findings in relatives of patients with chronic active hepatitis and primary biliary cirrhosis. Scand. J. Gastroent. 11, 313-320

92. Sayers, T.J., Binder, T., Berg, P.A. (1979) Heterogeneity of anti-mitochondrial antibodies: characterization and separation of the antigen associated with the pseudolupus erythematosus syndrome. Clin. Exp. Immunol. 37, 68-75

93. Sayers, T.J., Leoutsakos, A., Berg, P.A., Baum, H. (1981) Antimitochondrial antibodies (AMA) in primary biliary cirrhosis I. Separation of the PBC antigen activity from mitochondrial ATPase activity. J. of Bioenergetics and Biomembranes 13, 255-267

94. Schaffner, F., Popper, H. (1982) Clinical-pathologic relations in primary biliary cirrhosis Progress in liver disease, Chapter 31, 529-554

95. Scheuer, P.J. (1980) Liver biopsy interpretation 3rd ed. London, Ballière, Tindall and Cossell, 36-59

96. Schnaitman, C., Greenawalt, J.W. (1968) Enzymatic properties of the inner and outer membrane of rat liver mitochondria. J. Cell. Biol. 38, 158-175

97. Schultheiß, H.-P., Berg, P.A., Klingenberg, M. (1983) The mitochondrial adenine nucleotide translocator is an antigen in primary biliary cirrhosis. Clin. Exp. Immunol. 54, 648-654

98. Schultheiß, H.-P., Berg, P.A., Klingenberg, M. (1984) Inhibition of the adenine nucleotide translocator by organ specific auto-antibodies in primary biliary cirrhosis. Publikation in Vorbereitung

99. Schussler, G.C., Schaffner, F. (1978) Increased serum thyroid hormone binding and decreased free hormone in chronic active liver disease. N.Engl. J. Med. 299, 510-515

100. Shapiro, I.M., Smith, H., Schaffner, F. (1979) Serum bilirubin: a prognostic factor in primary biliary cirrhosis. Gut 20, 137-140

101. Sherlock, S. (1959) Primary biliary cirrhosis (chronic intrahepatic obstructive jaundice) Gastroenterology 37, 574-586

102. Sherlock, S., Scheuer, P.J. (1973) The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis. N. Engl. J. Med. 289, 674-678

103. Smith, A.L. (1976) Preparation, properties, and conditions for assay of mitochondria. In: Estabrook, R.W., Pullman, M.E.: Methods in enzymology X New York: Academic press, 81-86

104. Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., Bergstrand, A. (1967) An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. J. Cell. Biol. 32, 415-438

105. Stolpmann, R.M., Berg, P.A. (1984) Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis VII. Isolation of the complement-fixing ATPase associated antigen (M 2) from mitochondria of Neurospora crassa. Publikation in Vorbereitung

106. Thomas, H.C., de Villiers, D., Potter, B., Hodgson, H., Jain, S., Jewell, D.P., Sherlock, S. (1978) Immune complexes in acute and chronic liver disease. Clin. Exp. Immunol. 31, 150-157

107. Thomas, H.C., Potter, B.J., Sherlock, S. (1977) Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease? Lancet II, 1261-1262

108. Tong, M.J., Nies, K.M., Reynolds, T.B., Quismorio, F.P. (1976) Immunological studies in familial primary biliary cirrhosis. Gastroenterology 71, 305-307

109. Triger, D.R. (1980) Primary biliary cirrhosis: an epidemiological study. Br. Med. J. 281, 772-775

110. Tyler, D.D., Webb, P.R. (1979) Purification and properties of the adenosine triphosphatase released from the liver mitochondrial membrane by chloroform. J. Biochem. 178, 289-297

111. Walker, J.G., Bates, D., Doniach, D., Boll, P.A.J., Sherlock, S. (1972) Chronic liver disease and mitochondrial antibodies: a family study. Br. Med. J. 1, 146-148

112. Walker, J.G., Doniach, D., Roitt, I.M., Sherlock, S. (1965) Serological tests in the diagnosis of primary biliary cirrhosis. Lancet II, 827-831

113. Wands, I.R., Dienstag, J.L., Bhan, A.K., Feller, E.R., Isselbacher, K.J. (1978) Circulating immune complexes and complement activation in primary biliary cirrhosis. N. Engl. J. Med. 298. 223-237

114. Weckenmann, U., Weber, P., Stechemesser, E., Klöppel, G., Berg, P.A. (1982) Nachweis von Antikörpern gegen ein zytoplasmatisches Antigen bei Patienten mit primär-biliärer Zirrhose (PBC) und ihre Bedeutung im Hinblick auf Krankheitsaktivität und Prognose. Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 88, 1057-1061

115. Wojzicka, B.M. (1979) Separation and characterization of bile antigens In: Eddleston, A.L.W.F., Weber, I.C.P., Williams, R.: Immune reactions in liver disease Tunbridge Wells, England, Pitman Medical, 154-156

116. Wright, D.J.M., Doniach, D., Lessof, M.H., Turk, J.L., Grimble, A.S., Catterall, R.D. (1970) New antibody in early Syphilis. Lancet I, 740-744

L e b e n s l a u f

Am 27.12.1959 wurde ich, Reinhild Klein, als Tochter des Studienrats Otto Klein und der Wiltraud Klein, geb. Rosenkranz, in Tübingen geboren. Meine ersten Kindheitsjahre verbrachte ich in Friedrichshafen am Bodensee. Als mein Vater 1964 zum Oberstudiendirektor ernannt wurde, zogen wir nach Calw um. Dort besuchte ich von 1966 bis 1969 die Grundschule und anschließend das Hermann Hesse-Gymnasium. Nach dem Abitur im Sommer 1978 begann ich mit dem Wintersemester 1978/79 das Medizinstudium in Tübingen. Dort legte ich 1980 das Physikum, 1981 den Ersten und 1983 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Im Februar 1981 begann ich unter der Leitung von Prof. Dr. Berg an der Medizinischen Klinik mit Untersuchungen über antimitochondriale Antikörper bei der primär-biliären Zirrhose. 1983/84 habe ich das praktische Jahr in Tübingen absolviert und am 5.10.84 den schriftlichen sowie am 19.10.84 den mündlichen Teil des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung abgelegt. Am 25.10.84 erhielt ich meine Approbation als Arzt.
Zur Zeit arbeite ich als wissenschaftliche Angestellte im Immunpathologischen Labor Prof. Berg an der Medizinischen Klinik in Tübingen.